FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Année 1922

THÈSE

N° 2

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

JOSEPH, EUGÈNE DAUVERGNE

Né le 29 Mai 1875 à Paris

LE DIAGNOSTIC DU BACILLE

DE LA

DIPHTÉRIE

Président : M. le Dr BORREL, *Professeur*
Directeur de l'Institut d'Hygiène et de Bactériologie

PARIS
VEUVE ROUSSET
Libraire
1, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 1

1922

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Année 1922 — THÈSE — N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

JOSEPH, EUGÈNE DAUVERGNE

Né le 29 Mai 1875 à Paris

LE DIAGNOSTIC DU BACILLE DE LA DIPHTÉRIE

Président : M. le Dr BORREL, *Professeur*
Directeur de l'Institut d'Hygiène et de Bactériologie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PARIS
VEUVE ROUSSET
Libraire
1, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 1

1922

Faculté de Médecine de Strasbourg

Doyen : M. WEISS, O. ❋, ⚜ I.

Assesseur : M. BOUIN, ❋, ⚜ I.

Professeurs : MM.:

Embryologie	ANCEL, ❋, ⚜ I.
Anatomie	FORSTER, ⚜ A.
Histologie	BOUIN, ❋, ⚜ I.
Physiologie	MAYER, ❋, ⚜ A.
Physique biologique	WEISS, O ❋.
Chimie physiologique	NICLOUX, ⚜ I, ✠.
Anatomie pathologique	MASSON, ⚜ A.
Pharmacologie, médecine expérimentale	AMBARD, ⚜ I.
Hygiène, Bactériologie	BORREL, O ❋, ⚜ I.
Médecine légale	CHAVIGNY, O❋, ⚜I.
Clinique médicale	BARD, O ❋, ⚜ I. BLUM Léon, ❋, ⚜ A.
Clinique chirurgicale	SENCERT, O ❋, ⚜ I. STOLZ, ❋, ⚜ A.
Clinique ophtalmologique	DUVERGER, ⚜ I.
— dermatologique	PAUTRIER, ❋, ⚜ A.
— psychiatrique	PFERSDORFF, ⚜ A.
— neurologique	BARRÉ, ⚜ A.
— oto-rhino-laryngologique	N...
— gynécologique et d'accoushements	M. SCHIKELÉ, ⚜ I.

Chargés de cours : MM.:

ARON, ⚜ A.	GÉRY, ⚜ A.	REEB, ⚜ A.
BELLOCQ, ⚜ A.	GUNSETT, ⚜ A.	ROHMER, ⚜ A.
BLUM Paul, ❋, ⚜ I.	HANNS, ❋, ⚜ A.	SCHAEFFER.
BOEZ, méd. épid.	HUGEL, ⚜ A.	SCHWARTZ, ⚜ A.
CANUYT.	KELLER, ⚜ A.	STROHL (Agrégé), ⚜A
GELMA, ⚜ A.	LICKTEIG, ⚜ A.	VAUCHER, ⚜ A.
	et M. WEILL, ⚜ A.	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

INTRODUCTION

Malgré les nombreux travaux parus sur le bacille diphtérique, le diagnostic de ce microorganisme était resté imprécis jusqu'à ces dernières années. Si, pour une minorité de bactériologues connaissant bien ce germe, il n'y avait pas d'hésitation à le reconnaître, pour la généralité, c'était un diagnostic très difficile.

C'est qu'il existait une grande confusion entre le bacille diptérique, authentique, pathogène et d'autres germes similaires, poussant comme lui sur sérum coagulé, se colorant par la méthode de Gram et présentant comme lui une disposition spéciale (bacilles en palissade, en paquets d'épingles, etc.); or, ces derniers, simples saprophytes, étaient souvent rencontrés dans les mêmes habitats ; en réalité, ils n'ont rien de commun avec le bacille de Löffler.

En abordant la question du bacille diphtérique on tournait dans un cercle vicieux : l'empêchement où l'on était d'en faire le diagnostic précis était une entrave à l'étude de ses propriétés, et la méconnaissance de celles-ci met-

tait dans l'impossibilité d'en effectuer la détermination précise.

Cette confusion, qui s'était établie entre le bacille diphtérique et les germes voisins, remontait à l'origine même de la découverte du germe pathogène et, ce qui est plus grave, elle a été entretenue depuis cette époque par des bactériologues qui ne parlaient pas le même langage : pour les uns, en effet, il y avait à distinguer le bacille de Löffler, pathogène, du bacille d'Hofmann, non pathogène ; pour les autres le bacille diphtérique authentique devait se montrer virulent pour l'animal (cobaye ou oiseau), tandis que tout bacille qui ne se montrait pas virulent n'était pas du bacille diphtérique. Or, nous savons parfaitement bien qu'il existe des bacilles diphtériques provenant de malades, s'étant montrés, par conséquent, pathogènes, dépourvus malgré cela de toute virulence pour l'animal.

Le terme de pseudo-diphtérique fut employé par les uns à désigner les bacilles diphtériques avirulents et par les autres, au contraire, le bacille d'Hofmann : pour certains, il désignait un genre banal, tout différent du bacille de Löffler, pour d'autres, au contraire, cette dénomination concernait un bacille actuellement inoffensif mais pouvant se montrer tout à coup virulent et donner lieu à des cas de diphtérie.

Il est nécessaire de rappeler que l'idée dominante proportionnait la virulence à la longueur du bacille ; or, le bacille diphtérique court se montrant, en général, avirulent, il semblait naturel de le confondre avec le bacille

d'Hofmann, non pathogène, qui se montre presque toujours sous la forme courte.

Enfin, on méconnaissait aussi un autre germe très voisin du bacille diphtérique, beaucoup plus voisin de ce dernier que le bacille d'Hofmann, qui, simple saprophyte de la peau, pousse également bien sur le sérum coagulé et a pu parfois prêter à confusion.

Ainsi donc, non seulement le diagnostic était malaisé, mais encore l'obscurité qui régnait sur les véritables rapports qui existent entre le bacille diphtérique et les bacilles voisins avaient des conséquences graves : en effet, la notion d'un germe banal, hôte très fréquent de la gorge, rencontré souvent chez des individus sains, en dehors de tout milieu contaminé (parfois 50 fois sur 100 personnes, et même plus) et susceptible de recouvrer sa virulence sous des influences mystérieuses et de devenir, par suite, du bacille diphtérique pathogène, semblait démontrer l'inutilité de toute mesure prophylactique (recherche des porteurs, isolement).

La meilleure preuve de la réalité de cet état de choses est fournie par les statistiques des porteurs de germes dans les milieux civils et militaires, contaminés ou non. Suivant les auteurs, leur pourcentage varie de 20 à 30 environ, tandis qu'en utilisant les procédés qui permettent la détermination du nombre exact des porteurs de bacille diphtérique authentique, on ne dépasse pas le chiffre de 3 %.

Les procédés de diagnostic en usage jusqu'à ces dernières années étaient tellement peu satisfaisants que C.-W.

Broers a pu écrire en 1915 : « En lisant ces lignes, on peut avoir l'impression que le diagnostic bactériologique de la diphtérie est un travail à faire désespérer. »

Pour donner une idée de l'embarras où l'on se trouvait quand on avait à faire le diagnostic de bacille diphtérique, nous citerons des extraits d'un travail publié le 22 juillet 1917, par Aviragnet et Mlle Le Soudier, sur les « caractères différentiels entre le bacille de Löffler et le bacille d'Hofmann » dans le *Bulletin de la Société médicale des hôpitaux de Paris*, et paru huit jours avant notre note sur la « recherche et la détermination rapide du bacille diphtérique chez les malades et les porteurs ».

« Pour le bactériologue, disent les auteurs cités ci-dessus, la culture en tube de Veillon est des plus instructives; mais, pour le clinicien, elle est moins utile à cause du temps trop long qu'elle nécessite, quatre à cinq jours au moins.

« En pratique, il faut se contenter de la simple culture en vingt-quatre heures sur sérum, c'est-à-dire que le diagnostic de laboratoire pouvant aider la clinique doit s'établir d'après la morphologie ; or, on sait combien il est difficile de reconnaître sur les lames un bacille diphtérique court d'un bacille d'Hofmann long.

« Nous avons cherché à y parvenir après avoir étudié longuement des cultures pures de corynebacterium diphteriæ et de corynebacterium commune, identifiées au moyen des épreuves classiques et de la culture sur gélose.

« Il ne faut certainement pas attacher une valeur absolue à ce diagnostic rapide, basé sur les seuls caractères morphologiques; mais, en prenant certaines précautions, et surtout après avoir observé un grand nombre de bacilles courts diphtériques poussant sur gélose, et pathogènes pour le cobaye, on peut interpréter un grand nombre de cas douteux. Pour cela, il importe d'opérer suivant une technique rigoureuse, tant pour le prèlevement des exsudats et l'ensemencement des tubes, que pour l'examen macroscopique et microscopique des colonies sur sérum ; si bien que la bactériologie de la diphtérie, simple en principe, exige dans chacun de ses détails une grande minutie pour procurer au clinicien les renseignements dont il a besoin.

« L'étude de toutes les colonies du tube de sérum serait trop longue s'il fallait colorer chacune d'elles; cette étude est pourtant nécessaire pour affirmer la présence ou l'absence de bacille diphtérique. Avec un peu d'habitude, on groupe facilement les colonies d'après les caractères indiqués, et l'on ne colore que les différents types.

« L'examen de la culture ne présente pas de difficultés si le bacille diphtérique est abondant : mais si l'on ne trouve sur les premières lames que du bacille d'Hofmann, il faudra, pour que le diagnostic ait de la valeur, contrôler avec soin chaque colonie douteuse, c'est-à-dire moins humide ou un peu plus surélevée.

« Ces caractères différentiels (aspect des colonies, forme des bacilles ,granulations), sans doute difficiles à

saisir comme on devait s'y attendre entre deux bacilles si voisins, ne pouvaient être précisés avant l'épreuve sur gélose, les autres procédés de laboratoire ne permettant pas toujours, eux non plus, un diagnostic certain.

« Nous avons étudié ces différences morphologiques sur des échantillons identifiés après ensemencement sur gélose. Si l'on a pris la peine d'étudier ainsi un certain nombre de colonies des deux espèces, colonies parfaitement purifiées et bien colorées, il devient moins difficile de distinguer, à l'aide des seuls caractères morphologiques, un bacille diphtérique vrai d'un bacille diphtérimorphe non diphtérique.

« Cependant, on ne peut attribuer une valeur absolue à l'examen de laboratoire. Le bactériologiste peut certifier la présence ou l'absence de bacille diphtérique sur les lames qu'il a examinées; mais il a pu ne pas découvrir les colonies diphtériques existant dans le tube, si elles sont très rares, ou même ne pas cultiver le bacille, s'il est localisé au larynx ou à l'amygdale pharyngienne. »

La lecture de ces extraits, aussi bien que celle du travail *in extenso*, donnent l'impression que le diagnostic est environné d'incertitudes à chaque pas; tous les caractères invoqués doivent être l'objet d'une critique serrée et, après un travail minutieux, l'embarras est grand pour conclure; on verra, dans la suite du présent travail, que l'emploi du milieu horizon fait tomber toutes ces incertitudes et rend le diagnostic aisé, rapide et sûr.

Au cours de la guerre, on a assisté à une véritable évolution de la question : en 1917, en effet, de nouveaux procédés d'isolement et d'identification résolurent enfin le problème qui se pose aujourd'hui avec netteté et précision.

L. Martin et G. Loiseau ont, en effet, préconisé dans un but diagnostique, la culture du bacille diphtérique, préalablement isolé à l'état de pureté, en tube de Veillon, où ce germe se comporte comme un anaérobie, tandis que le bacille d'Hofmann ne pousse que dans la zone d'aérobiose. Ce procédé fut appliqué et étudié par Aviragnet et Mlle Le Soudier, Rist et R. Letulle, Stévenin; il fut perfectionné un peu plus tard par l'adjonction de teinture de tournesol qui permet de réduire le temps de culture nécessaire pour avoir la réponse; cette méthode mit enfin entre les mains des bactériologues un moyen sûr permettant de différencier le bacille de Löffler du bacille d'Hofmann.

La même année, nous nous sommes mis à notre tour en collaboration avec S. Costa et J. Troisier, à étudier la question, et de nos recherches est né le milieu horizon qui nous a permis l'étude comparative des fermentations sucrées du bacille diphtérique et des bactéries diphtérimorphes, ainsi que de leur pouvoir hémolytique : par ce procédé on sépare d'une façon catégorique le bacille de Löffler du bacille d'Hofmann, et cela dès le premier ensemencement; c'est donc à la fois un milieu d'isolement et d'identification.

Nous avons attiré l'attention sur la confusion possible qui pouvait s'établir entre le bacille diphtérique et le bac-

térium *cutis commune* de Ch. Nicolle, saprophyte du tégument cutané et nous avons établi le diagnostic différentiel entre ces deux germes par l'épreuve de la fermentation du saccharose : cette dernière bactérie doit être tenue en grande partie pour responsable des erreurs et des équivoques qui ont été monnaie courante dans l'histoire du bacille diphtérique (désaccord sur les fermentations sucrées, localisations bizarres, etc.); il ressemble étonnamment au bacille diphtérique et fait fermenter, en général, les mêmes sucres plus le saccharose.

Après avoir donné la classification du bacille diphtérique et des bactéries diphtérimorphes telle qu'on doit la concevoir dans la pratique courante des examens demandés par la clinique ou l'hygiène, nous passerons en revue les méthodes utilisées jusqu'ici pour le diagnostic du bacille diphtérique; nous n'aurons en vue, toutefois, que les méthodes simples, celles que l'on peut appliquer partout avec un microscope, des colorants et des milieux de culture, et non pas celles qui ont besoin d'un matériel compliqué ou coûteux (virulence, agglutination, déviation du complément, etc.).

La dernière partie sera consacrée à la description et au mode d'emploi du milieu horizon, dans les conditions où il a été appliqué par nous depuis mai 1917 jusqu'à la fin de la guerre, dans un laboratoire d'armée où nous étions chargé, entre autres choses, d'assurer la prophylaxie de la diphtérie chez les soldats du front et dans les

bataillons d'instruction, ainsi que la surveillance des malades, convalescents et porteurs des formations sanitaires d'une armée. Ce procédé, qui a été appliqué par nous avec des installations de fortune et un personnel parfois peu au courant, nous a rendu la tâche facile, sûre et rapide ; son emploi est à recommander comme étant susceptible de rendre de grands services aussi bien pour les examens cliniques que pour la surveillance des convalescents et le dépistage des porteurs de germes.

LE BACILLE DIPHTÉRIQUE et LES BACILLES DIPHTÉRIMORPHES : CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS

Au début de ce travail, il nous semble indispensable de donner la classification pratique du bacille diphtérique et des bacilles diphtérimorphes que l'on rencontre souvent en clinique, les caractères principaux permettant la distinction entre ces divers microorganismes et enfin leur dénomination et leur synonymie.

Dans un article publié en 1920, Albert J. Chalmers et Norman Mac Donald donnent, après d'autres auteurs, une classification du genre corynebacterium (Lehmann et Neumann, 1896) auquel appartient le bacille diphtérique; nous nous contenterons de citer ce travail dans lequel on trouvera la description des espèces étudiées, mais nous ne suivrons pas ces auteurs; notre but, en effet, est plus modeste et plus utilitaire; il ne s'agit pas pour nous de donner une classification botanique d'espèces du genre corynebacterium, mais d'un groupement où seront envisagés seulement les bacilles rencontrés journellement en

clinique lorsqu'on a à faire un diagnostic de bacille diphtérique.

Nous laisserons donc de côté les germes qui n'ont été aperçus que rarement et que nous considérons avec Aviragnet, Weill-Hallé et Marie, comme de simples curiosités de laboratoire sans importance pratique.

J'envisagerai donc seulement ici quatre espèces, l'une pathogène qui est le bacille de la diphtérie et trois autres saprophytes : le bacille d'Hofmann, rencontré fréquemment dans le nez et la gorge; le bacille de la xérose, rencontré sur les muqueuses oculaires dans les cas de xérose et le bacterium cutis commune, que l'on trouve sur le tégument cutané.

Ces espèces réunissent des individus ayant de gros caractères communs, mais nous ne nions pas qu'elles ne comportent des variétés, au contraire : par exemple, les essais d'agglutination que nous avions entrepris et qui n'ont pu être continués par suite des évènements, tendent déjà à le prouver.

Ayant injecté plusieurs fois à un chien un échantillon de bacille diphtérique virulent, le sérum de cet animal s'est montré très agglutinant pour le bacille injecté; nous avons obtenu les résultats suivants avec d'autres échantillons de bacilles :

Agglutination positive dans moins de 1/3 des cas;
Agglutination négative dans moins de 1/3 des cas;
Emulsion difficile ou agglutination spontanée dans plus de 1/3 des cas.

Avec le bacille d'Hofmann, nous avons préparé de même un sérum canin fortement agglutinant pour le bacille injecté.

Ayant soumis 30 échantillons de cette espèce de bacille à l'épreuve de l'agglutination avec ce sérum, nous avons obtenu 9 réactions positives et 21 réactions négatives.

Nous avons préparé un autre chien en lui injectant l'un des 21 bacilles qui n'avaient pas été agglutinés précédemment et nous avons obtenu un sérum fortement agglutinant pour ce bacille; parmi les 20 bacilles restant nous avons obtenu 2 agglutinations positives et 19 agglutinations négatives.

Avec le bacterium cutis commune nous avons fait de même : avec le sérum obtenu, sur 17 bacilles examinés, nous avons obtenu 8 réactions positives et 9 réactions négatives.

Le bacille diphtérique se présente sous trois formes : longue, moyenne et courte; on a voulu établir un parallélisme entre la longuer du bacille et la gravité de la maladie. «En réalité, disent Aviragnet, Weill-Hallé et P.-L. Marie, la division en forme longue, moyenne et courte a été la source d'erreurs nombreuses et elle a entretenu la confusion entre le bacille diphtérique court et le bacille d'Hofmann, infiniment plus commun que ce dernier, ce qui explique que les bacilles courts passaient pour peu ou pas dangereux. Le terme de bacille court était devenu synonyme de bacille douteux. Il n'y a pas intérêt à garder aujourd'hui cette division que ne justifie pas non plus la prétendue existence d'un pouvoir toxigène spécial à

chacune de ces diverses formes : la malignité de la maladie se juge aux signes cliniques et non à la longueur des bacilles. »

Et nous voici amené à aborder la question du bacille court, si facile à résoudre aujourd'hui grâce aux méthodes d'isolement et d'identification rapides, si difficile encore il n'y a pas bien longtemps, et qui a donné lieu à des discussions si nombreuses.

Il n'existe à l'heure actuelle qu'un bacille diphtérique : ce bacille produit de l'acidité avec le glucose, le lévulose, le galactose, le maltose, mais pas avec le saccharose; il est doué dans ses cultures de propriétés hémolytiques énergiques et pousse en anaérobiose dans la gélose de Veillon. Ce bacille peut se présenter sous trois variétés de formes différentes, il peut se montrer virulent ou non pour l'animal (cobaye ou oiseau), peu importe : un bacille poussant facilement sur sérum, prenant le Gram, dont les éléments sont disposés de façon spéciale sur les préparations (en palissade, en paquets d'épingles, etc.) et présentant les caractères énumérés plus haut, doit être considéré comme un bacille diphtérique pathogène et, par suite, dès qu'on en a constaté la présence chez un individu, on doit mettre en usage, suivant les cas, soit les moyens thérapeutiques spéciaux à la diphtérie, soit les mesures prophylactiques nécessaires vis-à-vis de cette maladie.

Le bacille court doit donc être envisagé de la même façon que les autres formes de bacilles et on ne doit plus faire de différence. A un moment où l'on ne connaissait

pas bien la part qui revenait au bacille diphtérique et celle qui revenait aux bactéries diphtérimorphes saprophytes, il pouvait paraître logique, vu le petit nombre de cas de diphtérie à bacille court, leur allure généralement moins grave et l'habituelle avirulence de cette variété de bacille vis-à-vis de l'animal, de le considérer lui-même comme un bacille non diphtérique ; cela évitait de prendre des mesures prophylactiques trop étendues, qui auraient pu englober des cas à bacilles d'Hofmann.

Aujourd'hui, il n'y a plus d'excuses à cette façon de faire; on isole tous les jours des bacilles diphtériques courts d'angines pseudo-membraneuses; on doit s'en méfier comme des autres formes, d'autant mieux que l'on sait facilement faire le diagnostic.

Je suis loin d'être de l'avis d'Orticoni et de Leclerc lorsqu'ils disent qu'ils estiment « qu'il ne faut pas tenir compte pour la recherche des porteurs, des bacilles courts, car le bacille court est une exception au point de vue botanique ».

Même si c'était une exception, il me semble qu'on devrait tout de même en tenir compte; or, il est loin d'être une exception, puisque L. Martin le trouve six fois sur deux cents cas et que nous l'avons nous-même trouvé aussi à peu près dans les mêmes proportions dans des cas d'angines pseudo-membraneuses.

Enfin, voici un fait relaté par Hutinel et qu'il nous semble utile de citer ici à l'appui de notre manière de voir : « Nous avons soigné au mois d'août 1913 un jeune enfant de trois ans atteint de croup; cet enfant fut opéré

et guéri. Il retourna dans sa famille à la campagne et tout se passa bien. En octobre, la famille revint à Paris, où l'enfant avait été malade. Quelque temps après, la mère a une angine. Le médecin, craignant une diphtérie, demande un examen bactériologique. On lui répond bacille court non diphtérique. La malade, non injectée, meurt; le père, affolé, nous explique le fait et demande un avis pour la nourrice et un enfant de trois mois qui, eux aussi, sont malades. La nourrice et l'enfant sont transportés à l'hôpital Pasteur : on trouve des fausses membranes avec bacilles courts, non virulents. Ces bacilles courts, non virulents, avaient cependant tué la mère avec des symptômes de diphtérie bronchique. »

Le bacille d'Hofmann ne produit pas d'acide avec les sucres : il se comporte comme un aérobie strict dans la gélose de Veillon et il est dépourvu de toute propriété hémolytique; il ne se montre pas pathogène et n'est pas virulent pour l'animal; c'est un saprophyte du nez et de la gorge. Souvent désigné par divers auteurs comme bacille pseudo-diphtérique, L. Martin a trouvé que c'était une appellation inexacte, attendu « qu'il n'a rien de diphtérique », et, pour faire cesser toute équivoque, il l'a dénommé corynebacterium commune.

D'après ce que nous avons pu constater au cours de nos recherches, il comprendrait au moins deux variétés, l'une à colonies humides, molles, blanches; l'autre à colonies sèches, d'aspect amiantacé, de forme irrégulière et, en

général, à surface ravinée. Ces deux variétés sont d'ailleurs sans action sur les sucres ; elles sont toujours globuleuses, de forme irrégulière, souvent losangique sans aplatissement ni ombilication.

Le bacille de la xérose est considéré aujourd'hui comme un simple germe d'association observé dans les cas de xérose conjonctivale. Ses cultures poussent très lentement, sont peu développées, sèches. Ce bacille produit de l'acide aux dépens du glucose, du lévulose, du galactose et du saccharose.

Le bacterium cutis commune, Ch. Nicolle, saprophyte du tégument externe, se rapproche beaucoup plus du bacille diphtérique que du bacille d'Hofmann; il produit de l'acide aux dépens du glucose, du lévulose, du galactose et du saccharose.

Il ressemble beaucoup au bacille de la xérose dont il s'en distingue seulement par la lenteur de croissance et la sécheresse des colonies qui caractérisent ce dernier.

Il n'y a donc aucune raison de ne pas faire rentrer ce germe dans le genre corynebacterium : je propose de le nommer corynebacterium cutis.

Cette dénomination, en effet, est conforme aux règles de la nomenclature binaire : elle rappelle, d'autre part, l'habitat de ce bacille ainsi que le nom que lui a donné Ch. Nicolle qui l'a étudié; enfin, elle évite la confusion qui ne manquerait pas de s'établir si on désignait ce germe sous le nom de corynebacterium cutis commune, étant

donné que le bacille d'Hofmann a été désigné par L. Martin sous le nom de corynebacterium commune.

Dans mon esprit, l'appellation de corynebacterium cutis serait provisoire, en attendant que de nouveaux travaux impliquant l'étude d'un assez grand nombre de souches de b. cutis commune et de b. xerosis aient permis de les réunir en une espèce commune; toutefois, à bien réfléchir, il paraîtrait plus rationnel, si cette assimilation se réalisait, de garder le nom de corynebacterium cutis comme celui de l'espèce type, saprophyte du tégument cutané et de ses dépendances ,et de ne voir dans le cor. xerosis qu'une simple variété du premier, d'importance moindre, à habitat plus limité, localisé seulement aux muqueuses oculaires, à mode de culture un peu spécial.

Nous résumons ci-après les caractères différentiels importants permettant de distinguer le bacille diphtérique des bactéries diphtérimorphes.

Corynebacterium diphteriæ. Löffler (Bacille de la diphtérie, bacille de Klebs-Löffler).

Bactérie de forme longue, moyenne, ou courte; se colorant par la méthode de Gram; se décolorant par l'alcool; présentant le plus généralement des granulations métachromatiques; pousse en profondeur dans la gélose Veillon; produit de l'acide aux dépens du glucose, du lévulose et du galactose, mais pas avec le saccharose; doué de propriétés hémolytiques se manifestant dans les cultures en moins de quatre jours; généralement virulent pour le

cobaye et l'oiseau, mais pas toujours; agent pathogène de la diphtérie.

Corynebacterium commune L. Martin (Bacille d'Hoï mann; bacille pseudo-diphtérique de certains auteurs).

Bactérie de forme généralement courte; se colorant par la méthode de Gram; ne se décolorant pas par l'alcool, même après quinze minutes; ne présentant généralement pas de corpuscules polaires métachromatiques; ne pousse qu'à la surface de la gélose Veillon; ne produit pas d'acide aux dépens du glucose, du lévulose, du galactose, ni du saccharose; dénué de toutes propriétés hémolytiques; non virulent pour les animaux; germe saprophyte rencontré souvent dans la gorge, le nez des individus sains.

Corynebacterium cutis, nouvelle dénomination (Bacterium cutis commune Ch. Nicolle; bacille paradiphtérique, Lubinski).

Bactérie de forme généralement moyenne ou courte; se colorant par la méthode de Gram; se décolorant par l'alcool; présentant des granulations métachromatiques dans la généralité des cas; cultive, en général, aussi bien à la surface que dans la profondeur de la gélose Veillon; produit de l'acide aux dépens du glucose, du lévulose, du galactose et du saccharose; dénué de propriétés hémolytiques sinon se manifestant tardivement; non virulent pour les animaux; germe saprophyte rencontré sur le tégument externe, les plaies.

Corynebacterium xerosis, Neisser et Kuschbert (Bacille de la xérose).

Bactérie de forme généralement courte, se colorant par la méthode de Gram; se décolorant par l'alcool; présentant des granulations polaires métachromatiques dans la généralité des cas; cultive en général à la surface et dans la profondeur de la gélose Veillon; produit de l'acide aux dépens du glucose, du lévulose, du galactose et du saccharose; dénué de propriétés hémolytiques; non virulent pour les animaux; germe saprophyte rencontré sur les muqueuses oculaires dans le xérosis. Cultures peu abondantes se développant très lentement.

MÉTHODES DE DIAGNOSTIC

Les méthodes employées pour effectuer le diagnostic du bacille diphtérique sont de deux ordres : les unes sont relatives à l'examen microscopique, les autres sont basées sur l'emploi de milieux de culture spéciaux. Ces méthodes ne s'excluent d'ailleurs pas et, d'ordinaire, elles se complètent.

Nous allons donc passer en revue les procédés de coloration des corpuscules métachromatiques, puis la méthode basée sur la décoloration facile du bacille diphtérique, coloré au Gram, par l'alcool absolu; puis viendront la description des divers milieux de culture sucrés, au sang, au sulfocyanure de potassium, aux composés de tellure et de sélénium, à la bile et enfin la gélose sucrée profonde. L'étude du milieu horizon formera à elle seule la dernière partie de ce travail.

Coloration des corpuscules métachromatiques

Babès a signalé, en 1885, la présence, chez le bacille diphtérique, de corpuscules métachromatiques ou corpuscules polaires, que l'on peut mettre en évidence par certains procédés de coloration dont voici les principaux.

Le procédé classique est celui qui est dû à Neisser,

On utilise les deux solutions suivantes :

a)	Bleu de méthylène.....	1 gr.
	Alcool à 90°.....	20 cc.
	Eau distillée	950 cc.
	Acide acétique glacial.....	50 cc.
b)	Vésuvine	2 gr.
	Eau distillée bouillante.....	1 litre.

Emulsionner dans une goutte d'eau versée sur une lame une parcelle d'une colonie âgée de 24 heures sur sérum. Colorer avec la solution *a* pendant quelques secondes, laver à l'eau, colorer avec la solution *b* pendant 3 à 5 secondes; laver à l'eau, sécher.

Les bacilles de Löffler sont colorés en brun et portent à leurs extrémités des grains colorés en bleu noir.

Neisser conseille de partir de cultures faites à 35° sur sérum de Löffler et âgées de 9 à 20 heures. L'expérience a appris que l'on obtient de bons résultats avec des cultures faites à 37° et qu'il est avantageux de faire agir le bleu de méthylène acétique et la vésuvine beaucoup plus longtemps qu'il n'est indiqué.

Le même auteur a indiqué un autre procédé de coloration; on utilise trois solutions :

a)	Bleu de méthylène.....	1 gr.
	Alcool à 96°.....	20 cc.
	Eau distillée	1000 cc.
	Acide acétique	50 cc.

b)	Cristal violet	1 gr.
	Alcool	10 cc.
	Eau distillée	300 cc.
c)	Chrysoïdine	1 gr.
	Eau chaude	300 cc.
	Filtrer.	

On colore pendant une seconde avec un mélange de deux parties de solution *a* et une partie de solution *b*, on lave et on fait agir pendant trois secondes la solution de chrysoïdine.

Les corps bacillaires sont colorés en jaune verdâtre; les corpuscules en violet foncé.

Ficker recommande la modification suivante :

On ajoute 2 centimètres cubes d'acide lactique pur à une solution de bleu de méthylène pur à 1 pour 1000; on met quelques gouttes de cette solution sur une lame, on applique dessus la lamelle portant la préparation de bacilles et on aspire le colorant avec un morceau de papier à filtrer. Les granulations se colorent en bleu foncé, tandis que les bâtonnets sont presque incolores.

Piorkowski part de cultures à 37° sur gélose glycérinée; il colore pendant $\frac{1}{2}$ minute avec du bleu de méthylène alcalin, en chauffant légèrement et il décolore ensuite, pendant 5 secondes, par l'acide chlorhydrique à 3 %; il lave à l'eau et recolore par une solution aqueuse d'éosine à 1 % pendant 5 minutes.

Van de Rovaart emploie le bleu de méthylène alcalin pendant 1 minute à 1 minute $\frac{1}{2}$, puis la vésuvine.

Le procédé Falière emploie la solution suivante :

Bleu de méthylène	1 gr.
Borax	0,5 cc.
Eau distillée	100 cc.
Alcool absolu	VIII gouttes.

Colorer, laver à l'eau, puis colorer le fond avec une solution de vésuvine à 1 %.

Ljubinsky fait agir sur la préparation préalablement fixée pendant $\frac{1}{2}$ à 2 minutes la solution suivante :

Pyocktanine	0,25 cc.
Acide acétique à 5 %.....	100 cc.

Après lavage à l'eau, on colore $\frac{1}{2}$ minute avec une solution de vésuvine à 1 %. Les granulations sont colorées en bleu foncé de dimensions considérables se voyant presque dans tous les bâtonnets; les contours des bacilles sont colorés en violet foncé se dessinant d'une façon très nette.

Ph. Blumenthal et Lipskerow disent beaucoup de bien du procédé de Ljubinski qu'ils préfèrent à celui de Faliéres : tous deux leur ont donné de bons résultats.

Epstein recommande la méthode suivante :

Colorer pendant 20 secondes avec une solution de pyronine ou avec la solution de bleu de Löffler pendant une

demi-minute; laver; traiter par la solution de Gram pendant 10 minutes; laver; sécher. D'après l'auteur, la pyronine constituerait le colorant de choix : les corpuscules polaires apparaissent comme des masses arrondies ou ovales d'une couleur sombre rouge brique, tandis que le bacille est habituellement d'un rouge clair. Dans quelques cas, les corpuscules polaires présentent une tache centrale réfringente incolore. Avec la solution de Löffler, les corpuscules polaires sont d'un noir verdâtre, les bacilles verdâtres.

Pour E. Gildemeister et Guntha, le procédé de Gins, consistant à traiter les frottis colorés à l'aide de la méthode de Neisser par la liqueur de Lugol renfermant 1 % d'acide lactique, présente de réels avantages. Les bacilles ont des contours très nets et les corpuscules polaires sont colorés avec une grande intensité.

Pour H. Reiter, au contraire, la méthode de Gins ne paraît pas présenter d'avantages sur les méthodes courantes.

Aviragnet et Le Soudier emploient le bleu de Roux avec recoloration par la chrysoïdine à 1 pour 300.

Le bleu de Roux a la composition suivante :

Solution aqueuse à 1 % de violet dalhia ..... 1 p.
Solution aqueuse à 1 % de vert de méthyle.. 3 p.

On ajoute assez d'eau au mélange pour avoir une belle teinte bleue pas trop foncée.

Tribondeau et Dubreuil préconisent la solution suivante :

Cristal violet	1 gr.
Acide phénique neigeux	2 gr. 5
Alcool méthylique	10 cc.
Eau distillée	90 cc.

Colorer pendant 5 minutes les bacilles émulsionnés dans une gouttelette d'eau distillée, puis desséchés et fixés à l'alcool absolu; laver à l'eau ordinaire; traiter par une solution de vésuvine à 1 pour 500 jusqu'à virage au brun; laver et sécher; les granulations polaires sont d'un beau violet noir, le corps des bacilles est jaune.

F. Arloing et G. Richard ont appliqué au bacille diphtérique la coloration vitale au bleu de Nil. Ils ont ainsi obtenu en goutte pendante, au bout de 5 à 10 minutes, avec une solution très peu concentrée, des bacilles colorés en bleu clair présentant des granulations roses, rouges et même mauves et violettes. La coloration obtenue est variable avec la nature du liquide dans lequel on met les bacilles en suspension : on obtient une coloration rapide et élective en employant l'eau physiologique à 9 p. 1000; les bacilles restent vivants.

Enfin, il y a lieu de signaler ici un bon procédé que j'ai employé pour la coloration rapide des granulations avec un seul colorant; il consiste à utiliser une solution de bleu de méthylène additionnée d'acétate d'alumine et même d'acétate de fer.

La formule suivante permet d'obtenir la coloration en 1 minute :

Solution aqueuse saturée de bleu de méthylène	10 cc.
Solution d'acétate d'alumine à 8 %	2,5 cc.
Solution d'acétate de fer à 8 %.....	0,8 cc.
Eau distillée, q. s. p.....	20 cc.

Avec la seconde formule, donnée ci-après, on obtient la coloration en 4 minutes :

Solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. 200	10 gr.
Solution d'acétate d'alumine à 8 p. 100.....	5 cc.
Eau distillée	5 cc.

L'addition à cette formule d'une très faible quantité de fuschine permet d'obtenir la coloration des corps de bacille en rouge, tandis que les corpuscules sont bleu foncé.

La recherche des granulations de Babès comme moyen diagnostique est discutée : si certains auteurs, comme Lesieur, Kaulbach, Graham Smith, Schekler, P. P. Lévy, Debré et Letulle, lui accordent une grande valeur, d'autres font des réserves; certains bactériologues, même, lui contestent toute valeur (Cathooire, Cadiot et Henry).

D'après Lehmann et Neumann, des bacilles diphtériques virulents se présentent parfois sans corpuscules, de telle sorte que leur absence n'exclut pas absolument le bacille diphtérique; de plus, le faux diphtérique peut parfois en présenter, ainsi que le bacillus xerosis. Les

mêmes auteurs relatent que Neisser lui-même a trouvé 3 échantillons sans corpuscules sur 39 bacilles virulents typiques dans tous leurs caractères.

« On a voulu attribuer, disent Dopter et Sacquépée, à ces granulations polaires un caractère différentiel important capable de séparer le bacille de Löffler des bactéries diphtérimorphes, où leur absence serait la règle. L'expérience montre que, présentes le plus souvent, elles peuvent se rencontrer dans les bactéries similaires. »

D'après Lesieur lui-même, qui a réuni dans sa thèse tous les détails techniques relatifs à la méthode de Neisser, 20 % des bacilles non virulents ont des granulations et 20 % des bacilles virulents n'en possèdent pas.

Rist, qui a beaucoup pratiqué jadis à l'hôpital Trousseau, la recherche des granulations par la méthode de Neisser, dit qu'il y a toujours des cas où elle laisse dans le doute.

Debré et Letulle estiment qu'avec un examen minutieux, on peut voir que les bacilles d'une colonie diphtérique ne sont jamais tous dépourvus de granulations polaires typiques, tandis que les faux bacilles diphtériques n'ont jamais de pareilles granulations bipolaires, à une exception près, celle du bacterium cutis commune.

Au cours de nos recherches nous avons vu que, sur 97 bacilles diphtériques vrais, authentiques, isolés par nous avec le milieu horizon et dûment identifiés, 88 présentaient des corpuscules polaires nets et abondants, 2 en

possédaient de nombreux, mais très petits, 7 en étaient dépourvus ou n'en possédaient qu'en très faible proportion. Sur 100 bacilles d'Hofmann, 81 en étaient totalement dépourvus, 13 en avaient quelques-uns, 2 en avaient de nombreux mais très petits, et 4 en possédaient de nets et abondants.

Ljubinski ayant fait l'examen bactériologique de 105 plaies, y a constaté la présence du bacille diphtérique dans 18 cas; dans 46 cas, il a trouvé des bacilles prenant le Gram, renfermant des corpuscules de Neisser, attaquant le saccharose, non pathogènes pour le cobaye et qu'on pourrait confondre avec le bacille de Löffler; pourtant, il dit qu'ils sont un peu plus épais et plus courts, et qu'ils n'en présentent pas la disposition; ces bacilles, qu'il appelle « para diphtériques », semblent devoir être rattachés, d'après leurs caractères et leur provenance, au groupe corenybacterium cutis.

Pergola ayant examiné les différentes méthodes de coloration des corpuscules métachromatiques, conseille de passer les préparations à l'iode pour enlever les granulations noires que le milieu au tellure pourrait avoir fait naître dans les corps bacillaires. D'après cet auteur, parmi les éléments nécessaires aux milieux de culture pour l'apparition des granulations métachromatiques dans les bacilles diphtériques, il faut citer le jaune d'œuf, la glycérine, le sérum sanguin et le glucose.

F. Arloing et G. Richard ont pu rendre granuleuses 3

souches de bacille d'Hofmann en utilisant le milieu horizon additionné d'extrait total de levure de bière ou de lécithine 3 %. Au bout de 24 à 36 heures, on observe des granulations polaires, se colorant vitalement et présentant le phénomène de la métachromasie; ces granulations sont transitoires et ne s'observent parfois plus au bout de 2 à 3 jours; certains individus peuvent garder ce caractère dans les cultures ultérieures faites sur les milieux usuels : ces bacilles ayant acquis des corpuscules métachromatiques restent dépourvus de virulence.

Pour conclure, nous dirons que la recherche des corpuscules polaires ne constitue pas une méthode rigoureuse qui permette le diagnostic différentiel entre le bacille de Löffler et le bacille d'Hofmann; en effet, elle est en défaut avec le premier dans bon nombre de cas, elle s'observe parfois, au contraire, avec le second; enfin elle ne permet pas non plus d'éliminer le bacillus cutis communis qui présente, lui aussi, des corpuscules polaires.

Décoloration par l'alcool

En 1913, Roeh et Meros ont employé, pour différencier le bacille de Löffler du bacille d'Hofmann, la résistance variable qu'offrent ces microbes à la décoloration par l'alcool lorsqu'on les a colorés par la méthode de Gram : en général, le premier garde sa coloration pendant plus d'une minute, mais finit par se décolorer, tandis que le second reste coloré après 10 minutes de contact avec l'alcool.

Langer et Krüger (1906) ont appliqué ce procédé : ils estiment qu'on peut l'employer avec des cultures toutes jeunes; ils ont essayé d'autres décolorants : l'alcool-acétone décolore le bacille de Löffler en 1 à 2 minutes, tandis que le bacille d'Hofmann conserve sa coloration plus de 5 minutes. L'alcool chlorhydrique est plus énergique encore mais évidemment moins pratique.

D'après Landau, la spécificité du procédé n'est pas aussi stricte que l'avaient indiqué les auteurs qui s'en étaient occupés; il cite notamment le cas d'un leptothrix ressemblant au bacille de Löffler et pouvant être confondu avec lui : il se décolore de la même façon; le diagnostic entre le bacille diphtérique et les bacilles du groupe leptothrix devient plus difficile qu'on ne le croit généralement. Landau isola un bacille ayant tous les caractères du bacille diphtérique (forme, disposition, virulence) qui, en première culture, ne se décolora pas, mais qui, dans les cultures ultérieures, se décolora en peu de temps.

Schmitz a examiné un grand nombre de cultures de bacilles diphtériques et de bacilles d'Hofmann ; d'une manière générale, il a constaté la décoloration rapide du premier par l'alcool et la non décoloration du second; mais sur les bacilles diphtériques âgés de quelques mois, surtout dans les formes de dégénérescence, il a constaté que la coloration persistait. Il a eu affaire, entre autres, à deux souches qu'il considère comme des formes de passage entre les deux sortes de bacilles, qui, à l'origine, se décoloraient assez facilement mais qui, quelques mois

après, ne se décoloraient plus. Schmitz recommande, lorsqu'on emploie ce procédé, la recoloration à l'aide de l'éosine ou de la vésuvine.

Münzberg (1917) avance que ce procédé comporte des restrictions et qu'il est des bacilles d'Hofmann qui finissent par se décolorer; selon lui, si le procédé peut rendre des services lors de l'examen de cultures pures, il n'en est pas de même lorsqu'on a affaire à des cultures provenant de l'ensemencement direct de la gorge : dans ce cas, le procédé perd de sa valeur, parce que la flore de la cavité buccale comprend à la fois beaucoup de bacilles ne prenant pas le Gram et d'autres qui, prenant le Gram, se décolorent à la suite d'un traitement prolongé par l'alcool.

Aviragnet et Mlle Le Soudier estiment que « cette méthode peut être utile, mais que tous les intermédiaires existent, car certains bacilles d'Hofmann sont décolorés et certains bacilles diphtériques gardent bien le colorant; l'interprétation, dans ces conditions, est difficile ».

Ainsi donc, le procédé de décoloration par l'alcool ne constitue pas une méthode rigoureuse de diagnostic différentiel entre le bacille de Löffler et le bacille d'Hofmann, ni avec le corynebacterium cutis d'ailleurs; de plus, il est d'une application très délicate lorsqu'on a affaire à des cultures impures provenant de l'ensemencement direct de la gorge.

Milieux de différenciation

Le milieu de culture qui a donné, depuis la découverte du bacille diphtérique, les meilleurs résultats, est le sérum coagulé; Löffler a ajouté du bouillon à ce milieu et l'a rendu ainsi plus nutritif, mais au détriment de son électivité; en effet, la qualité principale du sérum, celle qui en a rendu l'emploi journalier, c'est que le bacille diphtérique y pousse très bien, mieux que les autres germes saprophytes qui l'accompagnent.

Nous examinerons les milieux qui ont été proposés pour différencier le bacille diphtérique d'avec les bacilles diphtérimorphes.

Milieux sucrés

Dès 1888, Roux, dans son mémorable travail, avait indiqué que le bacille diphtérique produit de l'acidité dans les cultures en bouillon; en 1889, Zarnico, ajoutant du glucose à du bouillon alcalin, trouvait que, dans ce milieu, le bacille diphtérique donnait lieu à la production d'acide, tandis qu'il n'y en avait pas avec le bacille d'Hofmann. Escherich, à son tour, reconnut à ce procédé une réelle valeur. Enfin, par la suite, un grand nombre de bactériologues étudièrent l'action du bacille diphtérique sur les sucres.

Nous résumons dans le tableau suivant les résultats obtenus par les divers auteurs : une partie est emprun-

tée à l'ouvrage de Kolle et Wassermann (article diphtérie, Neisser et Gins); nous avons complété ce tableau.

PRODUCTION D'ACIDE PAR LE BACILLE DIPHTÉRIQUE

AUTEURS	Glucose	Lévulose	Maltose	Galactose	Saccharose	Lactose	Mannite	Dulcite	Glycérine	Dextrine
L. Martin	+	+	—	+	+	—	—	—	+	
Th. Schmith					—	—				
Knapp	+		+		—	—	+			+
Graham Schmith	+	+	±	+	±	+	—		±	±
Kulikoff	+	+				+	—			
Neisser et Gins	+	+			—					
Rothe	+	+	±		—	—	—			
Moshage et Kolmer	+	+		+	—					
W. E. Cary	+		±		±				+	±
Zinsser					—					+
Lubenau	+	+	+		—	±				+
Roussel et Malard	+	+			—	—				
Cathoire, Cadiot, Henry	+				—					
Stévenin	+	+	±		—	+	—			
Costa, Troisier, Dauvergne	+	+	+	+	—	—	—	—		

Neisser et Gins (1913) s'expriment ainsi au sujet des résultats obtenus par les divers auteurs : « Un coup d'œil sur notre tableau montre nettement qu'il existe une certaine concordance (entre les auteurs), mais de résultats constants, comme on doit en exiger d'une méthode de valeur de diagnostic différentiel, le bacille diphtérique n'en donne pas vis-à-vis des différents sucres. »

Kolle et Hetsch, dans leur bactériologie expérimentale,

disent, en 1914, qu'on ne peut fonder aucun diagnostic sur la production d'acide par le bacille diphtérique.

Quelles peuvent donc être les causes de ces divergences, qui ont fait délaisser l'usage de milieux sucrés pour le diagnostic du bacille diphtérique, alors qu'on les emploie sur une si large échelle lorsqu'on étudie les autres germes pathogènes; comment se fait-il qu'avec notre milieu horizon nous ayons obtenu des résultats si constants et si satisfaisants?

Il y a plusieurs causes.

Tout d'abord, la difficulté d'isolement du bacille diphtérique dans les tubes de sérum : des cocci n'apparaissant pas à l'examen direct des colonies prélevées, peuvent se développer par la suite et modifier la réaction des milieux sucrés; citons en particulier les streptocoques dont les colonies sont très petites et qui fermentent énergiquement les sucres. Si l'on n'apporte pas aux vérifications la plus minutieuse attention, si on ne multiplie pas les examens et les passages, les résultats obtenus peuvent être entachés d'erreur.

Une cause importante d'erreur provient de la difficulté d'obtenir, dès le début, la séparation des bacilles diphtériques et des bacilles diphtérimorphes; cette séparation s'effectuait en utilisant des caractères contingents (présence de granulations, virulence, forme, etc.).

La méconnaissance du corynebacterium cutis est encore un source d'erreur importante, à cause de sa grande res-

semblance avec le bacille diphtérique, son action sur les sucres, la présence de granulations, etc.

La plupart des études ont été faites avec des milieux liquides tournesolés : il est souvent difficile d'apprécier avec précision le changement de teinte.

Parfois, ces milieux étaient exactement neutralisés et, par suite, trop sensibles ; c'est ainsi que, si cette pratique avait été adoptée pour les bacilles du groupe typhique, jamais on ne serait parvenu à établir les différenciations si nettes qui existent aujourd'hui et qui rendent le diagnostic possible; ainsi le bacille typhique attaque légèrement le glucose et le lactose, mais insuffisamment pour produire dans les milieux employés les virages que provoquent les paratyphiques.

Enfin, il y a lieu d'attirer l'attention sur les résultats erronés que peut entrainer l'emploi de solutions de certaines substances stérilisées dans de mauvaises conditions; il ne faut pas oublier, en effet, que la dextrine peut s'hydrolyser, ainsi que le saccharose, le maltose et le lactose, à chaud et surtout en présence des acides : par exemple, le saccharose peut de la sorte être transformé, au moins en partie, en un mélange de glucose et de lévulose, le lactose en un mélange de glucose et de galactose; le maltose en glucose; or, on remarquera précisément que le bacille diphtérique ne donnant pas d'acide aux dépens du saccharose ni du lactose, peut en donner si ces solutions ont été hydrolysées.

Nous allons indiquer les principaux milieux sucrés qui ont été utilisés pour le diagnostic du bacille diphtérique,

Milieu de Rothe :

Sérum de bœuf.....	4 parties.
Bouillon neutre	1 partie.
Solution tournesol Kahlbaum..	10 %.
Glucose	1 %.

On mélange 4 parties de sérum de bœuf avec 1 partie de bouillon neutre dépourvu de sucre; à 90 parties de ce mélange on ajoute 10 parties de solution de tournesol de Kahlbaum, additionné auparavant de 10 % de glucose ou de lévulose. On stérilise la solution de tournesol par tyndalisation en la portant 3 jours de suite, pendant 20 minutes, dans l'autoclave à 100°. Le mélange est versé dans des boîtes de Pétri et coagulé.

Milieu de Cathoire :

C'est de la gélose ascite glucosée à 2 % et tournesolée.

Milieu de Tochtermann :

Ce milieu renferme 3 parties de sérum de mouton additionnées de 2 parties de gélose glucosée à 0,5 %.

Milieu de Thiel :

Peptone.....		
Nutrose.....	âà	1 gr.
Glucose.....		

Sel de cuisine.....	0 gr. 05.
Tournesol de Kahlbaum.....	5 gr.
Eau	100 gr.

Milieu de Hiss :

Sérum de bœuf.....	1 partie.
Eau	3 parties.
Solution de tournesol.....	0,5 %
Glucose.....	1 %

Milieu de Riemsdijk :

Eau	100 gr.
Sucre	1 gr.
Peptone	1 gr.
Chlorure de sodium.....	0 gr. 5.
Teinture de tournesol.....	6 gr.

Neutraliser avec de l'acide lactique.

Les premiers de ces milieux, qui sont solides, paraissent pouvoir être employés à la fois comme milieux d'isolement et d'identification; malheureusement, s'ils permettent la culture du bacille diphtérique, ils ne sont pas électifs et les autres germes y poussent trop facilement.

Il n'y a donc pas à faire de distinction entre ces divers milieux qui ne peuvent servir qu'à l'identification de germes préalablement isolés sur sérum ordinaire à l'état de pureté.

Milieux au sang

En 1901, Lubeneau avait montré que les hématies, mises en contact avec des cultures de bacille diphtérique, étaient hémolysées.

En 1910, Mendelbaum et Heinemann avaient étudié plus en détail cette question, en se servant comme milieu de culture de gélose glycérinée sur laquelle on étendait quelques gouttes de sang humain : ils avaient trouvé que les colonies de bacille de Löffler étaient blanches avec halo brun jaunâtre, tandis que le bacille de Hofmann donnait des colonies rouges avec halo brun rougeâtre.

Neisser et Gins ont perfectionné la technique en mélangeant le sang avec le milieu nutritif; ils ont trouvé que le bacille diphtérique donne des colonies verdâtres avec halo net, le bacille d'Hofmann des colonies blanches sans halo et le bacille de la xérose des colonies verdâtres sans halo.

En 1914, G. Schwoner, qui avait étudié plus en détail cette question de l'hémolyse, avait cru voir que, seules, les cultures provenant d'individus atteints de diphtérie grave, « septicémique », étaient douées du pouvoir hémolytique.

Nous avons repris les recherches sur cette question en partant de bacilles diphtériques et diphtérimorphes qui avaient été isolés à l'aide de notre milieu et dont l'action sur les sucres et le mode de culture avaient été étudiés de façon à nous fixer exactement sur la nature des germes expérimentés.

Les milieux solides ne nous ayant pas donné satisfaction, nous nous sommes adressés, après quelques tâtonnements, au milieu suivant :

Extrait de viande de Liebig....	10 gr.
Peptone	20 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Eau	1000 gr.

On complète le volume, après préparation, de façon à ce que la concentration en chlorure de sodium soit bien de 5 gr. pour 1000, on répartit en tubes et on stérilise.

Les tubes sont ensemencés et additionnés de 1 à 2 gouttes d'hématies humaines prélevées aseptiquement par ponction veineuse et déplasmatisées. On peut aussi employer les hématies de lapin, de cobaye, de cheval, de singe ou de mouton.

Après un séjour variable à l'étuve, la diffusion de l'hémoglobine est manifeste dans les cultures de bacille de Löffler; les globules rouges restent intactes, au contraire, dans celles de bacille d'Hofmann.

Nos essais ont porté sur 92 bacilles diphtériques vrais d'origines diverses (angines pseudo-membraneuses, porteurs, etc.) et de formes variées, sur 94 bacilles d'Hofmann et sur 19 races de bacterium cutis commune.

Nous avons observé que le bacille d'Hofmann n'hémolyse pas, même après 7 à 8 huit jours d'étuve, et que le bacterium cutis commune n'hémolyse pas ou bien tardivement (après 5 jours); enfin, le temps au bout duquel se produit l'hémolyse avec le bacille de Löffler est varia-

ble, indépendant de la forme du bacille et aussi de son origine : dans tous les cas, elle se produit toujours en moins de 4 jours.

Ainsi les bacilles diphtériques étudiés ont manifesté leur pouvoir hémolytique de la façon suivante :

24,6 %	ont hémolysé	en moins de	6 heures.
29,8 %	—	—	12 heures.
46,7 %	—	—	18 heures.
63,6 %	—	—	24 heures.
89,6 %	—	—	48 heures.
97,5 %	—	—	3 jours.
100 %	—	—	4 jours.

Dans ces recherches, il faut surtout se méfier des streptocoques dont certaines races sont très hémolysantes et qui peuvent souiller les cultures sans que l'attention soit attirée; nous avons été particulièrement satisfaits de l'emploi du milieu horizon qui nous a permis, dès les cultures de début, d'obtenir très aisément les bacilles à l'état de pureté absolue.

On le voit donc, le pouvoir hémolytique permet de bien différencier le bacille de Löffler d'avec tous les bacilles diphtérimorphes, y compris le bacterium cutis commune. Malheureusement, dans la pratique courante des examens journaliers, cette épreuve demande trop de temps, si l'on se trouve en présence d'un bacille hémolysant tardivement; elle nécessite, en outre, l'isolement préalable du bacille. Néanmoins, au cours de certaines recherches, c'est un caractère diagnostique de premier ordre qu'il ne faut

pas négliger et qui a contribué à fortifier la classification établie entre le bacille diphtérique et les bacilles diphtérimorphes.

Milieux au sulfocyanure de potassium

En 1911, Rankin a proposé l'emploi du sulfocyanure de potassium pour favoriser la croissance du bacille diphtérique en retardant la culture des autres microorganismes ; le milieu qu'il emploie renferme, en outre, du glucose et du rouge neutre; en voici la formule :

Sérum sanguin de mouton.....	3 parties.
Bouillon	1 —
Glucose	0,5 %.
Sulfocyanure de potassium.....	1 %.
Solution de rouge neutre à 1 %..	1 %.

Répartir le mélange dans des boîtes de Pétri et coaguler par la chaleur.

Le milieu de Coplans est ainsi constitué :

Sérum	1 partie.
Bouillon	1 —
Glucose	0,5 %.
Sulfocyanure de potassium.....	1 %.
Solution de rouge neutre à 5 %..	2 %.

Le milieu nutritif achevé a une couleur orange et vire au rose ou au rouge en présence de bactéries acidifiantes,

telles que le bacille diphtérique; l'auteur prétend qu'on pourrait distinguer le bacille diphtérique des autres espèces par la couleur des colonies et se passer d'examen microscopique.

Hanau (1913) a utilisé ce milieu dans 67 cas, comparativement avec le sérum de Löffler : il a constaté d'abord que les différences de couleur entre les colonies de bacille diphtérique et celles d'autres espèces ne sont pas telles qu'on puisse se passer d'examen microscopique; de plus, la diffusion de la couleur dans le milieu fait que ce dernier apparaît parfois rouge à des endroits où il n'y a que des bactéries non acidifiantes; il conclut finalement qu'il n'y a aucun avantage à se servir de ce milieu.

Milieux aux composés de tellure

Conradi et Troch, en 1912, ont préconisé un milieu de culture à base de sérum, additionné de bouillon et de tellurite de potasse dont voici la préparation.

A 1000 centimètres cubes d'eau, on ajoute 10 gr. d'extrait de viande, 5 gr. de sel, 20 gr. de peptone Witte et 6 gr. de malate acide de calcium; on chauffe une demi-heure, on filtre et on ajoute 1 % de glucose; on fait refroidir, puis on ajoute 3 parties de sérum de bœuf frais et stérile; enfin, à 100 cent. cubes de mélange, on ajoute 2 cent. cubes d'une solution centésimale de tellurite de potasse. On répartit en boîtes de Pétri qu'on expose dans un appareil à coaguler le sérum pendant 15 minutes à 85-90°.

Le tellurite aurait ici une action retardatrice sur les germes autres que le bacille diphtérique ; de plus, ce dernier, en réduisant le sel, donnerait des colonies noires, tandis que les bacilles d'Hofmann donneraient des colonies dont la teinte varie du gris clair au gris noirâtre.

Dans l'esprit des auteurs, l'ensemencement devait se faire d'abord sur une boîte de sérum de Löffler et ce n'est qu'après ce premier isolement qu'on devait passer les colonies sur sérum au tellure.

Neisser donne comme un caractère essentiellement constant la couleur noire que prennent les colonies de bacille diphtérique vis-à-vis des autres bactéries et notamment des bacilles d'Hofmann, quoique, parmi ces derniers, il en est qui prennent une coloration plus ou moins brunâtre.

W. Schürmann et E. Hajos (1913) préconisent l'ensemencement direct sur sérum au tellure sans passer préalablement sur sérum de Löffler; ils recommandent l'emploi du bouillon tellurique à 1 % en vue de l'enrichissement en bacilles diphtériques.

Trautmann et Gaehtgens reprochent à ce procédé la variété de nuances que présentent les colonies de bacille diphtérique (depuis le gris jusqu'au noir), la coloration noirâtre que prennent d'autres bactéries et, enfin, le fait que les formes de bacilles deviennent partiellement atypiques; ils considèrent son emploi comme utile lorsqu'il s'agit d'étudier des cultures pures au cours de

recherches spéciales, mais ils n'en recommandent pas l'emploi pour les examens courants.

Baerthlein, tout en admettant la variation de teinte des colonies, reconnaît à ce milieu une grande électivité.

Heinemann conclut de ses recherches qu'on peut se passer de sérum tellure.

Klunker, à la suite d'essais pratiqués sur 140 cas, dit que la méthode n'est pas inférieure à celle de Löffler, mais qu'elle n'en est pas non plus une amélioration; il ne lui reconnaît pas de valeur en ce qui concerne la pratique courante; elle montre simplement certaines réactions biologiques.

E. Gildemeister et Guntha dénient tout avantage à l'emploi du milieu au tellure sur les milieux usuels.

Hanau a employé ce procédé dans 94 cas : il a constaté que les colonies de bacille diphtérique n'étaient pas toujours noires, mais parfois seulement gris foncé ou brunâtres et que, notamment, les colonies de staphylocoques donnaient aussi des colonies gris noir. Il conclut que, d'après les résultats qu'il a obtenus, la méthode ne présente pas de supériorité sur celle deLöffler, mais que, dans certains cas, elle permet plus facilement de trouver les bacilles diphtériques.

Markl et F. Pollak se sont servis de cette méthode, mais il faut croire qu'ils ne la considèrent pas comme très probante, puisqu'ils parlent d'y adjoindre les milieux au rouge neutre, au sang, au tournesol glucosé et d'effectuer le dosage de l'acidité produite.

L. Tompakow reproche au procédé sa lenteur; en outre, il dit qu'il ne faut pas compter sur un diagnostic différentiel entre le bacille diphtérique et les bactéries cocciformes, beaucoup d'entre elles donnant également des colonies noires et volumineuses.

M. Pergola, en 1918, a préconisé pour l'isolement du bacille diphtérique deux milieux à l'œuf et au tellure, dont voici la formule :

Gélose à l'œuf :

Gélose ordinaire à 1,7 %.....	100 cc.
Tellurite de potasse à 1 %.....	2 cc.
Jaunes d'œuf.....	n° 1.

Sérum à l'œuf :

Sérum normal de bœuf.....	50 cc.
Solution de chlorure de sodium à 0,8 %	50 cc.
Tellurite de potasse à 1 %.....	2 cc.
Jaunes d'œuf	n° 1.

Le tellurite de potasse à la dose de 1 p. 5000 ajouterait aux qualités électives du milieu à l'égard du bacille diphtérique.

Milieux à la bile

En 1913, Drigalski et Bierast ont préconisé l'addition de bile au sérum avant sa coagulation : ils ont trouvé que cela facilitait l'isolement du bacille diphtérique.

Büsing, en 1914, a appliqué ce procédé dans 250 cas

de diphtérie, comparativement avec la méthode de Löffler; il conclut en disant que l'addition de bile ne présente pas d'avantages.

Helen R. Odell, en 1918, a repris les mêmes essais comparatifs en opérant sur 400 cas; il ne nie pas que, dans certains cas, la présence de la bile ne s'oppose au développement de quelques germes communs de la bouche, en particulier des staphylocoques, mais, à son avis, cette méthode ne présente pas de supériorité sur la méthode de Löffler pour l'isolement et l'identification du bacille diphtérique.

Gildemeister et Guntha ne trouvent aucun avantage à l'emploi des milieux à la bile sur les milieux habituels.

Milieux aux composés de sélénium

L. W. Axenoff, en 1914, s'est demandé si on ne pourrait pas substituer le sélénium au tellure dans le milieu qui avait été préconisé par Conradi et Troch.

Il a vu que les colonies de bacille diphtérique passaient successivement au fur et à mesure de leur vieillissement par les nuances jaune, orange, puis rouge brique; lorsqu'on pratique l'ensemencement sur milieu mixte au tellure et au sélénium, la coloration rouge l'emporte.

D'autres bactéries se colorent également en rouge sur milieu au sélénium, mais plus tardivement (streptocoques, staphylocoques, etc.).

Anaérobiose

Roux et Yersin ont signalé les premiers le développement anaérobie du bacille diphtérique; Hofmann a indiqué que ce dernier pousse sur le trajet de la piqûre en gélose profonde, tandis que le bacille qui porte son nom envahit la surface du tube sans pousser en profondeur.

En 1914, Heurlen a étudié l'anaérobiose du bacille diphtérique en employant le milieu suivant :

Gélose	1 %.
Glucose	1,5 %.
Solution normale de carbonate de soude	10 cc.
Eau	100 cc.

Il conclut qu'on peut séparer de cette manière le bacille de Löffler du bacille d'Hofmann.

En 1916, L. Martin et Loiseau ont préconisé la culture du bacille diphtérique en tubes de Veillon; voici la formule du milieu employé :

Bouillon	1 litre.
Gélose	15 gr.
Glucose	8 gr.
Nitrate de potasse	2 gr.

Il faut, recommandent les auteurs, toucher la colonie avec un petit crochet de verre et diluer dans un tube contenant 10 cent. cubes de bouillon, la très petite quantité

prélevée, en l'écrasant le long de la paroi du tube; agiter le tube pour bien répartir les microbes; faire fondre la gélose d'un tube de Veillon dans l'eau à l'ébullition, faire refroidir rapidement à 50°; prélever avec une petite pipette stérile 1 cent. cube du bouillon contenant la dilution du bacille et la répartir dans toute la hauteur du tube de gélose en mélangeant soigneusement; refroidir le tube de gélose et le mettre à l'étuve.

L'aspect de la culture varie suivant l'espèce de bacille ensemencé.

Quand il s'agit de bacille diphtérique, on constate un semis abondant de colonies très fines, uniformément réparties sur toute la hauteur du tube, sans prédominance dans la zone d'aérobiose. Ces tubes retirés de l'étuve et gardés à la température de la chambre pendant plusieurs jours, ne montrent pas un changement appréciable.

Pour le bacille d'Hofmann, la culture est moins rapide; elle n'est ordinairement visible qu'après 36 ou 48 heures. Les colonies, d'ailleurs plus volumineuses, se développent près de la surface, dans une zone de 2 à 3 millimètres avoisinant l'air libre; toutes les autres parties du tube sont privées de colonies. A la température de la chambre, les colonies donnent, au bout d'une huitaine de jours, un développement exubérant et envahissant toute la surface libre.

Il y a lieu de faire remarquer que la prolifération des colonies du bacille d'Hofmann à la surface du tube de Veillon n'apparaît bien que lorsque ce tube a été capuchonné; dans le cas contraire, la surface du tube se des-

sèche fortement à l'étuve, puis plus lentement à froid; mais, dans ce cas, on n'observe plus les colonies exubérantes, parfois confluantes et donnant un aspect crémeux à la surface de la gélose.

L. Martin et Loiseau ont modifié leur méthode en employant des tubes de gélose glucosée tournesolée; voici la technique qu'ils indiquent :

1° Préparer de la gélose à 30 p. 1000, la répartir en tubes sur 6 cm. environ de hauteur, stériliser à l'autoclave.

2° Préparer la solution :

Eau distillée	200 cc.
Glucose	3 gr.
Teinture de tournesol (Poulenc)..	30 cc.

Faire dissoudre le glucose dans l'eau distillée, ajouter la teinture de tournesol, neutraliser avec de la soude décinormale et filtrer à la bougie.

3° Faire fondre la gélose d'un certain nombre de tubes par ébullition assez prolongée, refroidir les tubes à 50° environ; avec une pipette à boule, répartir dans chaque tube de gélose liquéfiée environ 5 cent. cubes de la solution glucosée tournesolée stérilisée par filtration à la bougie et amenée au bain-marie à la température de 50° environ; agiter pour obtenir une coloration uniforme. Refroidir les tubes ainsi préparés et, quand la gélose est solide, éprouver leur stérilité par un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°.

Pour utiliser ces tubes on les liquéfie par chauffage au bain-marie; après refroidissement à 50°, on les ensemence avec du bouillon contenant une émulsion de bacille à déterminer.

Martin et Loiseau partent toujours d'une colonie bien isolée sur sérum; il faut bien savoir qu'une première séparation n'est jamais suffisante pour obtenir une colonie pure; on devra toujours s'assurer par l'examen microscopique de la pureté de la colonie.

Après 18 heures, les tubes ensemencés avec du bacille diphtérique sont devenus rouges et, à la loupe, on voit des colonies dans toute la hauteur du tube, rien à la surface.

Les tubes ensemencés avec du bacille d'Hofmann restent bleu violacé et même deviennent bleu franc; il y a des colonies très abondantes au voisinage de la surface, rien dans la profondeur.

Le caractère différentiel basé sur le développement en anaérobiose du bacille de Löffler et en aérobiose du bacille d'Hofmann perd de sa valeur avec le corynebacterium cutis. Celui-ci pousse, en effet, généralement d'une façon mixte, en profondeur et en surface; ce caractère suffirait au diagnostic s'il était constant; malheureusement il est loin d'en être ainsi, certaines souches se comportant comme des anaérobies, d'autres ayant un caractère aérobie. Certains bacilles même donnent en Veillon une culture toute spéciale caractérisée par un disque nébuleux à 0,5 cent. environ de la surface et un piqueté discret de

colonies au-dessous de ce disque sur une hauteur de 1 à 2 centimètres.

Le procédé de Martin et Loiseau qui a été appliqué et étudié par Aviragnet et Le Soudier, par Rist et Letulle, par Stevenin, etc. et par nous-mêmes, possède une grande valeur diagnostique et permet de séparer sûrement le bacille de Löffler du bacille d'Hofmann; il a contribué puissamment à établir définitivement la distinction entre ces deux germes.

« Malheureusement, disent Aviragnet et Le Soudier, la culture en gélose profonde glucosée ne peut être faite qu'après 4 ou 5 jours pour que la colonie soit bien purifiée; elle ne peut donc servir dans les conditions habituelles. »

« Malheureusement, dit encore Rist, le procédé de M. Martin demande plusieurs jours, 5 ou 6 au minimum.»

En résumé, excellente méthode d'identification au point de vue scientifique, épreuve que l'on ne doit pas négliger de faire lorsqu'on veut vérifier, au cours d'un travail, des souches de bacilles provenant du pharynx; sa valeur diminue pour les autres provenances, attendu qu'elle ne permet pas de faire le diagnostic différentiel des bacilles de Löffler ou d'Hofmann avec certaines races de corynebacterium cutis; en outre, elle exige l'isolement préalable du germe et sa purification; elle est donc, de l'avis même des cliniciens, trop longue dans la pratique courante.

LE MILIEU HORIZON

Description et préparation

Le milieu horizon n'est autre chose que du sérum glucosé tournesolé, additionné d'une faible quantité d'acide sulfurique à 10 p. 1000, réparti en boîtes de Pétri et coagulé.

Lorsqu'on étudie l'action du bacille diphtérique et des bactéries voisines sur les divers sucres, on remplace le glucose par le sucre étudié, les autres composants du milieu ne variant pas.

Voici les proportions employées :

Sérum de cheval stérile.....	100 cc.
Solution aqueuse de glucose à 30% stérilisée	10 cc.
Teinture de tournesol concentrée stérilisée	XXX gouttes.
Solution aqueuse d'acide sulfurique à 10 gr. pour 1000 stérilisée	3 cc.

COMPOSANTS

Sérum. — Nous avons utilisé de préférence le sérum de cheval parce qu'il est toujours facile de s'en procurer en abondance et aseptiquement au moyen d'un trocard introduit dans la jugulaire. Ce sérum est préférable à celui du bœuf, parce que la séparation du caillot s'effectue plus aisément et qu'on peut l'obtenir exempt de coloration.

L'emploi du sérum frais ou vieilli est indifférent : nos premiers essais ont été faits avec des flacons de sérums thérapeutiques périmés et nous ont donné de bons résultats.

Sucre. — Rien de particulier à dire sur la solution de glucose à 30 % utilisée; certains auteurs, dans un but d'économie, ont voulu diminuer la quantité employée; nous avons toujours conservé la concentration primitivement adoptée.

Lorsqu'on se propose d'effectuer le diagnostic différentiel avec le corynebacterium cutis, il faut employer une solution stérile de saccharose à 30%; on doit s'assurer que cette solution ne renferme bien que du saccharose et qu'elle n'a pas subi un commencement d'inversion; il n'y a qu'à faire un essai à la liqueur de Fehling.

Teinture de tournesol. — On n'emploie pas la teinture de tournesol usuelle des laboratoires de chimie, dont il faut employer une trop grande quantité, ce qui dilue le milieu, et qui renferme de l'alcool, dont on devrait la

débarrasser au préalable; on utilise de la teinture concentrée, soit la marque R A L, soit encore celle que l'on peut préparer facilement soi-même en partant de tournesol en pains qu'on épuise avec une petite quantité d'eau tiède (après lavage préalable à l'alcool bouillant); cette teinture doit avoir une belle teinte bleu foncé bien franche; il faut rejeter celles qui présentent une teinte violet sale qui donneraient des milieux gris et non bleu horizon.

Acide sulfurique. — La solution à 10 gr. p. 1000 peut être préparée en pesant de l'acide sulfurique pur à 66° Beaumé et en le diluant dans l'eau. Si l'on part de la liqueur normale (à 49 gr. par litre), on la diluera ainsi :

Liqueur normale d'acide sulfurique..	20 cc. 4
Eau distillée.....	Q. S. pour 100 cc

La solution est répartie en tubes et stérilisée.

Remarque importante : il faut employer la solution à 10 gr. pour 1000 et non à 10 cent. cubes pour 1000; la densité de l'acide sulfurique pur étant de 1,842, on aboutirait dans le deuxième cas à une solution à 18 gr. 42 par litre qui serait trop forte et qui, employée dans les proportions indiquées, donnerait un milieu acide, coloré en rouge.

Choix des récipients. — Le récipient de choix pour ce milieu, celui que nous avons adopté dès nos premiers essais, est la boîte de Pétri; on évitera d'en prendre ayant le fond bombé et on les choisira à fond bien plat; dans le cas contraire, le milieu n'est pas en couche uniforme,

mais il présente des parties où il est en couche trop mince.

Cette inégalité de répartition présente deux inconvénients : 1° difficultés de l'ensemencement consistant en ce que les parties trop minces du milieu sont très fragiles et qu'elles se déchirent facilement au passage de l'anse de platine; 2° troubles dans l'évolution des colonies et de leur virage qui se trouvent entravés par suite de la dessiccation précoce du milieu en ces points.

Répartition. — On introduit dans chaque boîte de Pétri, soigneusement stérilisée au préalable, une quantité convenable du mélange sérum-glucose-tournesol (environ 11 à 12 cent. cubes pour une boîte de grandeur moyenne de 10 cent. de diamètre) variable avec la grandeur de la boîte.

Si l'on emploie une trop faible quantité du mélange, la couche obtenue est trop mince et présente les inconvénients signalés plus haut; si, au contraire, on en emploie de trop, la coagulation est plus difficile à obtenir régulièrement et on risque d'avoir une boîte opaque, moins propice à l'examen des colonies.

Coagulation. — Nous conseillons l'emploi d'un stérilisateur à air chaud; l'étuve Poupinel nous a donné toute satisfaction à cet égard.

Les boîtes sont réparties dans l'étuve en les plaçant bien horizontalement et en évitant de les empiler les unes sur les autres, sinon en chicane; ne pas en préparer trop à la fois, mais procéder plutôt par fournées successives;

la surveillance en est plus aisée et le travail plus régulier.

La température doit être élevée progressivement et lentement : une fois la température de coagulation obtenue (température qu'on ne peut fixer d'une façon absolue, parce qu'elle peut varier avec la disposition de l'appareil et avec la place occupée par le thermomètre), on la maintient environ 1 heure à 1 heure 15.

Les boîtes sont sorties encore très chaudes, retournées brusquement et entr'ouvertes pour rejeter l'eau de condensation (environ 1 cent. cube pour une boîte de dimensions moyennes).

Le milieu doit être bleu horizon très légèrement bleu verdâtre, de consistance ferme et élastique, non opaque; une anse triangulaire de platine promenée à sa surface doit glisser facilement sans entamer le milieu; choquée légèrement contre cette surface, cette anse doit rebondir : ces moyens d'appréciation attestent la bonne préparation du milieu.

Si l'on ne dispose pas d'un laboratoire bien outillé, on peut préparer facilement un certain nombre de boîtes et en opérer la coagulation sur un bain-marie; les boîtes sont, dans ce cas, placées sur de petits taquets de bois reposant sur le couvercle métallique du bain-marie; on doit, dans ce cas, recouvrir les boîtes avec du papier à filtrer pour empêcher la condensation de la vapeur d'eau des boîtes sur la paroi intérieure des couvercles; ces grosses gouttes d'eau, en retombant sur le milieu en cours de coagulation, y produisent, en effet, des trous.

MODE D'EMPLOI

Pour que l'emploi du milieu horizon donne toute satisfaction, nous insisterons sur trois recommandations importantes qui sont relatives aux soins apportés aux prélèvements, à l'emploi de l'anse de platine triangulaire lors des ensemencements et, enfin, à l'usage de la boîte de Pétri.

Prélèvements. — D'une façon générale, il importe que pour tout examen bactériologique les prélèvements soient effectués avec un soin tout particulier : c'est, en effet, le point de départ de toutes les recherches, souvent délicates, qui s'ensuivent. Qu'il s'agisse d'échantillons quelconques, le bactériologue lui-même devrait être chargé de ce soin, ou à son défaut, une personne bien pénétrée de l'importance de cet acte et instruite à cet effet ; dans la pratique, il est loin d'en être ainsi et il arrive bien souvent qu'on apporte dans les laboratoires des échantillons de toutes sortes prélevés n'importe comment, par n'importe qui et au moyen d'un matériel quelconque stérilisé ou non.

Dans notre pratique personnelle, au laboratoire d'armée, les prélèvements étaient toujours effectués par l'un de nous; Aviragnet et Mlle Le Soudier attachent également de l'importance à ce sujet et ils estiment que ce soin revient au médecin traitant lui-même.

En ce qui concerne spécialement les prélèvements à effectuer dans la gorge de malades atteints d'angines suspectes, de convalescents ou de porteurs, on utilisera des tampons de coton, montés sur tiges de fer galvanisé, très légèrement coudées, placés dans des tubes à essais bouchés au coton et stérilisés; la forme coudée de ces tampons permet d'effectuer à la fois des prélèvements d'exsudats bucco-pharyngés et rhino-pharyngés, comme il a été conseillé de le faire chez les porteurs.

Il importe dans cette opération des prélèvements: 1° d'éviter de prélever des bactéries banales qui seront plus tard une cause de gêne pour les cultures; 2° d'opérer au lieu d élection eu égard à l'affection en cause.

Pour obéir à la première indication il suffit d'observer certaines précautions très simples dont il est facile de juger de l'opportunité dans chaque cas; opérer, en général, sur une gorge propre (emploi de gargarismes, faire moucher le patient); éviter soigneusement de prélever de la salive et de toucher avec le tampon la langue, les joues ou les lèvres; on évite ainsi le prélèvement de nombreuses bactéries saprophytes de la salive et de la cavité buccale dont certaines se montrent très gênantes dans les cultures faisant fermenter les sucres et liquéfiant même parfois le sérum.

Pour se soumettre à la seconde indication, il faut suivre les recommandations d'Aviragnet et de Mlle Le Soudier, que nous résumons ici sans insister autrement : pour les angines pseudo-membraneuses, on touche non pas la fausse-membrane, mais la muqueuse d'alentour; dans le cas d'angine érythémateuse, on opérera sur la face postérieure de la luette, le sommet de l'amygdale ou sur les piliers postérieurs; dans les coryzas suspects, on s'occupera non seulement du nez, mais aussi du rhino-pharynx; dans le croup sans angine, on ira jusqu'à la base de l'épiglotte ou l'orifice supérieur du larynx; chez les tubés, l'appareil pourra donner matière à ensemencement après son expulsion; dans les angines malignes, opérer comme pour les autres angines, l'ensemencement seul en sera plus soigné.

Une fois en possession des tampons, il n'est pas nécessaire de pratiquer de suite les ensemencements : le bacille diphtérique s'y conserve vivant et on peut les utiliser après 1 ou 2 jours.

Ensemencements. — La pratique usuelle comporte l'ensemencement avec le tampon qui a servi aux prélèvements.

L. Martin, Aviragnet et Mlle Le Soudier se servent de la spatule pour les prélèvements comme pour les ensemencements. L. Martin n'est pas partisan du tampon ; Aviragnet et Mlle Soudier lui reprochent d'ensemencer une trop large surface de muqueuse et, par suite, de donner lieu à des cultures trop chargées.

Nous employons une technique mixte : le tampon nous sert uniquement pour prélever, nous pratiquons les ensemencements sur les boîtes de milieu horizon avec une anse triangulaire de platine, de 1 cent. environ de côté. Ayant stérilisé au préalable cet instrument par passage dans la flamme, on laisse refroidir un court instant, puis on passe la branche horizontale sur le tampon; ensuite, d'un mouvement léger de va-et-vient, on promène délicatement sur toute la surface de la boîte en procédant par segments parallèles et sans jamais repasser deux fois à la même place.

Les boîtes ensemencées sont mises à l'étuve à 37°, le couvercle en dessous.

Ce procédé d'ensemencement à l'anse de platine triangulaire a été employé également par nous pour la recherche des méningocoques dans les exsudats rhino-pharyngés, des bacilles typhiques, dysentériques et autres, dans les matières fécales et il nous a toujours donné satisfaction en nous fournissant de belles boîtes où les colonies étaient bien isolées : il est bien préférable à celui qui consiste à frotter le tampon ou à déposer une goutte de matière en un point de la boîte et à l'étaler ensuite; dans ce dernier cas, cela fait perdre une portion de la surface de la boîte qui se présente aussi sous un vilain aspect.

Choix du vase de culture. — Dans la description de notre procédé, nous n'avons jamais parlé que de boîtes de Pétri pour le milieu horizon; c'est que nous n'avons jamais voulu entendre parler d'un autre récipient : tous

les résultats obtenus par nous et décrits dans nos diverses publications ont été obtenus avec la boîte de Pétri.

Pour des raisons évidemment très plausibles, pendant la guerre, on a voulu remplacer la boîte de Pétri, d'abord par la boîte de Pinoy, puis par le tube à essais ordinaire, enfin par un tube spécial à faces planes et à section carrée ; il s'agissait alors de pouvoir expédier aux armées du milieu tout préparé et on ne pouvait évidemment pas envoyer des boîtes de Pétri qui se seraient cassées en route ou contaminées.

Nous avons cherché à nous servir des boîtes de Pinoy ou des tubes et nous y avons renoncé très rapidement ; autant le milieu horizon en boîtes de Pétri s'est montré, non seulement entre nos mains, mais encore en d'autres mains (Debré et Letulle, Orticoni, Grisez, Fortineau, etc.), fidèle, facile à employer, autant le tube nous a donné de déboires, et on comprend très bien maintenant que ce tube adressé dans tous les laboratoires aux armées, n'ayant pas donné satisfaction aux bactériologues qui l'ont essayé, ait provoqué le discrédit le plus complet sur la méthode.

Or, nous le répétons, la boîte de Pétri fait, pour ainsi dire, partie du milieu horizon ! Le tube avec milieu horizon est tout au plus bon au repiquage d'un germe déjà isolé et qu'on veut identifier; mais, alors, ce n'est pas là le but que nous nous étions proposé, puisque nous donnons notre milieu comme servant à la fois à l'isolement et à l'identification (lorsqu'il s'agit de malades atteints d'angine, de convalescents ou de porteurs).

Lorsque nous avons fait nos premiers essais, nous avons pensé qu'il n'y avait pas lieu de rechercher le bacille diphtérique autrement que pour les autres bacilles et nous ne voyions pas pourquoi nous aurions conservé le tube; les avantages de la boîte sur le tube (visibilité, condensation peu intense, facilité d'observation, d'accès et de prélèvement des colonies pures, large surface, etc.) sont indiscutables; mais lorsqu'il s'agit spécialement du milieu horizon, les défauts du tube paraissent amplifiés et en font rejeter absolument l'emploi.

Que de fois n'avons-nous pas vu des bacilles liquéfier le tube classique de sérum et rendre, par suite, le diagnostic très malaisé, sinon impossible; c'est bien pis avec les tubes de milieu horizon.

Il nous est arrivé d'observer des liquéfiants sur des boîtes du même milieu : dans chaque cas, il nous a été permis d'obtenir les bacilles diphtériques à l'état pur sans être gêné par la liquéfaction qui restait localisée en certains points; nous n'aurions pu avoir ces résultats avec le tube.

LÉGITIMITÉ DE SON EMPLOI

Lorsque, après la période d'essais, nous avons été amenés à établir la formule définitive du milieu horizon, nous avons continué pendant un certain temps à utiliser le tube de sérum coagulé. Les ensemencements étaient effectués comparativement sur les deux milieux, afin de bien s'assurer que pas un cas de diphtérie ne pouvait être méconnu et que le nouveau milieu était avantageux à employer. Nous n'avons pas tardé à reconnaître sa réelle supériorité sur l'ancien procédé. C'est alors que nous nous sommes mis à isoler un assez grand nombre de bacilles d'origines diverses, diphtériques et diphtérimorphes, que nous avons étudiés en détail.

Pour chaque bacille on notait l'origine, la forme, l'aspect et la couleur de la colonie sur milieu horizon, l'absence ou la présence de granulations, l'aspect de la culture en tube de Veillon (qui venait d'être préconisé par Martin et Loiseau).

Peu de temps après, nous avons étudié l'action de ces bacilles sur divers sucres ou hydrates de carbone et aussi le pouvoir hémolytique de ces microorganismes.

Voici la liste des bacilles étudiés par nous :

Bacilles diphtériques, donnant des colonies rouges sur milieu horizon glucosé, lévulosé, saccharosé, maltosé; blanches sur milieu horizon saccharosé, lactosé, mannité; doués de propriétés hémolytiques se manifestant entre 12 heures et 4 jours; donnant des colonies dans la profondeur de la gélose Veillon.

57 angines pseudo-membraneuses;
3 angines érythémateuses;
3 angines pultacées;
1 stomatite à fausses membranes;
5 convalescents de scarlatine;
1 rhinite à fausses membranes;
5 porteurs convalescents;
22 porteurs sains.

15 échantillons de ce bacille ne fermentaient pas la dulcite.

Bacilles d'Hofmann : donnant des colonies blanches sur milieu horizon, glucosé, lévulosé, galactosé, maltosé, saccharosé, lactosé, mannité ; dénué de toutes propriétés hémolytiques; ne poussant qu'à la surface des tubes de Veillon :

3 angines pseudo-membraneuses à bacille diphtérique (1);

2 angines pseudo-membraneuses sans bacille diphtérique;

(1) Chez ces sujets on a trouvé à la fois le bacille de Löffler et le bacille d'Hofmann.

9 angines simples;
2 malades atteints de rougeole;
1 porteur de bacille diphtérique vrai (1),
73 sujets sains;
1 ulcération syphilitique de l'amygdale;
1 conjonctivite unilatérale;
1 fosses nasales.

9 échantillons de ce bacille ne fermentaient pas la dulcite.

Corynebacterium cutis : donnant des colonies rouges sur milieu horizon glucosé, lévulosé, galactosé, saccharosé; blanches sur milieu horizon lactosé, mannité; ne possédant pas de propriétés hémolytiques ou bien rarement et tardivement; cultive, en général, à la surface et dans la profondeur de la gélose Veillon.

5 peau (dont 3 souches de l'Institut Pasteur);
4 œil;
1 nez;
5 cavité buccale;
1 oreille externe;
1 urines;
2 suppurations chroniques.

Quelques échantillons de ce bacille ne fermentaient pas la dulcite.

On le voit, le milieu horizon, qui nous avait été d'un précieux concours pour l'isolement et l'identification des

(1) Chez ce sujet on a trouvé à la fois le bacille de Löffler et le bacille d'Hofmann.

souches étudiées nous a été également très utile pour l'étude des fermentations de divers sucres; cette dernière, jointe aux recherches sur l'hémolyse, ont contribué pour une bonne part à établir la classification entre le bacille diphtérique et les bactéries diphtérimorphes.

En ce qui concerne spécialement le bacille diphtérique, nous avons pu nous rendre compte que la production d'acide aux dépens des sucres, les propriétés hémolytiques, la durée de l'hémolyse, l'anaérobiose sont absolument indépendantes de la forme du bacille (longue, moyenne ou courte) et de l'origine (angines, porteurs, etc., etc.).

Le bacille d'Hofmann se caractérise par ses caractères plutôt négatifs (pas d'acide, pas d'hémolyse, pas d'anaérobiose); il diffère nettement du bacille de Löffler et ne peut être confondu avec lui; « il n'a rien de diphtérique » (L. Martin).

S'il n'y avait jamais eu que ces deux bacilles en cause, j'ai l'impression que leur distinction aurait pu être faite plus tôt; mais le corynebactèrium cutis est plus près du bacille diphtérique; comme lui il fait fermenter plusieurs sucres et, en plus, le saccharose; il a dû être pris souvent pour du bacille diphtérique et prêter à confusion.

Indépendamment des souches que nous avions isolées, nous en avons reçu de l'Institut Pasteur, sans en connaître l'origine, et que l'on nous demandait d'identifier afin de se rendre compte de la valeur du procédé : ces cultures comprenaient des spécimens de bacilles diphtériques et de bacilles d'Hofmann, mais aussi de corynebacterium

cutis; c'est à la suite de ces essais qui ont paru convaincants que cet établissement a commencé la préparation et l'envoi de milieu horizon dans les laboratoires militaires pendant la guerre.

L'emploi du milieu horizon, outre les services qu'il nous a rendus dans le travail journalier, nous a permis de découvrir l'origine de plusieurs épidémies de diphtérie, d'assurer une prophylaxie efficace et enfin de faire des constatations intéressantes chez les porteurs de germes; on trouvera des détails dans le travail paru dans la revue d'hygiène.

EXAMEN DES BOITES

L'examen des boîtes a lieu généralement au bout de 24 heures; toutefois, on peut le retarder jusqu'à la 36e heure, si l'on ne voit pas encore de colonies caractéristiques; il arrive que la croissance et le rougissement des colonies peuvent être retardés surtout lorsque la coagulation du sérum a été imparfaite ou que la couche du milieu est trop mince.

En général, les colonies de bacille diphtérique, parfaitement isolées, apparaissent au bout de 24 heures, rouges au centre et rosées à la périphérie; vues à la loupe devant une fenêtre, elles sont assez transparentes pour donner l'image des travées sous forme d'une petite croix; légèrement globuleuses, de consistance plutôt ferme, elles s'enfoncent dans le milieu à la façon d'une tête arrondie de clou de tapissier enfoncée dans un tapis.

Au même moment, les colonies de bacille d'Hofmann apparaissent plus étalées, plus opaques, de consistance différente; elles sont d'aspect blanchâtre ou gris.

Plus tardivement, les différences s'accentuent encore; les colonies de bacille diphtérique restent toujours parfai-

tement circulaires; dès qu'elles atteignent 3 à 4 millimètres de diamètre, elles se déprimen au centre, s'ombiliquent en s'aplatissant, à la manière des pustules varioliques, avec une zone centrale surélevée, séparée de l'anneau périphérique en relief par un sillon circulaire, en même temps la coloration rouge se fonce en diffusant progressivement dans le milieu.

Les colonies de bacille d'Hofmann s'en distinguent non seulement par le défaut de coloration, mais encore par leur forme irrégulière et globuleuse, souvent losangique, leurs bords dentelés et crénelés, leur consistance plus molle, la surélévation de la zone centrale qui s'abaisse progressivement vers la périphérie.

Le corynebacterium cutis, qu'on rencontre sur le tégument externe, mais excessivement rarement dans le pharynx (environ 0,13 pour 100 examens), constitue en réalité un groupe formant plusieurs variétés.

Parfois les cultures sont exubérantes, tantôt le développement est lent et maigre comme pour le corynebacterium xerosis; ce caractère n'est pas fixe, car au bout de quelques passages, on constate souvent un enrichissement progressif des cultures; sur le milieu horizon glucosé, le rougissement se produit généralement avec plus de lenteur que pour le bacille diphtérique, parfois au 3e ou 4e jour.

Quand le virage se fait en 24 à 36 heures, les colonies de corynebacterium cutis ressemblent beaucoup à celles du bacille diphtérique; même forme régulière, même cupule centrale entourée d'un sillon circulaire.

Les colonies sont moins plates que celles du bacille diphtérique; la périphérie est assez souvent crénelée ou dentelée, le sérum est parfois liquéfié tardivement; enfin, il y a souvent production de pigment de couleur grise ou jaune qu'on ne retrouve jamais chez le bacille de Löffler.

CRITIQUES

Composition. — Une première critique est celle relative à la composition du milieu horizon; on a prétendu que l'addition de glucose lui enlevait ses qualités électives vis-à-vis du bacille diphtérique. En réalité, il n'en est rien et c'est un fait d'expérience que l'on constate aisément : en effet, si on ensemence comparativement des mucosités bucco-pharyngées sur des boîtes de gélose, de gélose-ascite, de sérum coagulé et de milieu horizon, on s'aperçoit que les deux dernières boîtes ont une flore comparable comme espèces et comme nombre de colonies, tandis que dans les deux premières, les colonies sont beaucoup plus variées et plus nombreuses.

L'addition de glucose au sérum n'a donc pas présenté d'inconvénients comparables à ceux d'autres produits nutritifs tels que le bouillon, peptone, nutrose, etc., faites par maints auteurs.

La présence du glucose dans le milieu fait que les moisissures s'y développent facilement, mais cela provient toujours de fautes de technique et s'observe pour tous les milieux sucrés en général.

Préparation. — On a prétendu que la préparation du milieu était difficile; je crois qu'il existe, en bactériologie, bien des milieux dont la préparation est au moins aussi délicate, sinon davantage, ceux notamment où on utilise le sang, le liquide d'ascite, le sérum, l'albumine d'œuf que l'on mélange à de la gélose et pour lesquels la température doit être comprise entre des limites assez étroites, pas trop haute pour ne pas coaguler les albumines, pas trop basse pour que la gélose ne se solidifie pas.

Au surplus, qu'on veuille bien se reporter à notre pratique : ce milieu, après la période d'essais, fut appliqué par nous dans la technique courante à l'exclusion de l'ancien procédé qui fut définitivement laissé de côté; s'il n'avait pas présenté d'avantages et si sa préparation n'avait pas été facile, nous n'en aurions certes pas continué l'usage. Nous avons pratiqué avec lui des milliers d'ensemencements nécessités les uns par les recherches cliniques, le dépistage et la surveillance des porteurs, les autres par l'étude de l'action des germes isolés sur les différents sucres; la préparation de ce milieu a été effectuée maintes fois dans des conditions sommaires d'installation, parfois avec un personnel de fortune et peu préparé : nous n'avons jamais eu d'ennuis. Au fur et à mesure des besoins, nous avions toujours prêtes des boîtes en nombre nécessaire, quelque élevé que fût ce nombre.

Matériel. — La méthode a été accusée d'utiliser beaucoup de matériel et de sérum. Si l'on réfléchit qu'avec

une seule boîte de Pétri renfermant du milieu horizon on peut faire le diagnostic sûr de bacille diphtérique dans le cas de malade atteint d'angine ou de porteur, par une simple coloration par la méthode de Gram portant sur une colonie suspecte; on voit facilement que c'est là le minimum de matériel et aussi de travail; bien mieux, pour les porteurs, nous utilisions une boîte seulement pour deux sujets.

Prenons maintenant la méthode du tube de sérum: l'ensemencement, pour avoir des colonies pures, demande à être fait sur plusieurs tubes; si la colonie n'est pas pure, il faut la purifier sur un autre tube; ensuite l'identification demande encore l'ensemencement en Veillon ou sur milieu sucré (tel que le milieu horizon glucosé et saccharosé); enfin, l'examen se complète par la recherche des granulations métachromatiques ou de la résistance à la décoloration par l'alcool. Que de matériel, que de travail, que de temps de perdu! Si encore on aboutissait à un diagnostic ferme, mais certains de ces procédés sont infidèles, nous l'avons déjà vu; enfin, ce qui est plus grave, c'est que, pendant ce temps, le médecin attend la réponse.

Conservation. — La conservation du milieu horizon en boîtes de Pétri n'est pas aléatoire comme on l'a prétendu. Quand les boîtes ont été bien préparées avec tous les soins voulus, elles se conservent facilement, sans précautions spéciales, une quinzaine de jours à la température ordinaire, ou mieux au frais; à la glacière, la durée de la conservation est plus longue; j'ai vu des boîtes ayant

été ainsi conservées deux mois et qui, ensemencées, ont donné d'excellents résultats.

. *Envahissement par les saprophytes; rougissement total.* « Il est parfois difficile d'obtenir un isolement suffisant des germes, surtout lorsqu'il s'agit d'angines; les streptocoques et les staphylocoques, qui souillent les colonies obtenues, provoquent le rougissement du milieu et créent des difficultés d'interprétation ; on peut considérer comme diphtérique une colonie de bacille d'Hofmann qui, pure, ne rougirait pas le milieu, mais qui, associée à ces microbes, provoque le virage. Aussi, réservons-nous l'emploi de cette méthode au cas où la flore pharyngée n'est pas trop exubérante et nous pensons qu'elle est surtout de mise chez les sujets susceptibles d'être porteurs de bacilles; là, surtout, lors de recherches faites en masse, elle pourra rendre de précieux services. » Ainsi s'expriment Aviragnet, Weill-Hallé et P.-L. Marie.

Si les auteurs de cette appréciation ont en vue le tube, nous sommes de leur avis, mais s'ils veulent parler de la boîte de Pétri, nous sommes d'avis contraire.

N'y a-t-il donc qu'à propos du bacille de la diphtérie que l'on est exposé à voir un bacille pathogène pour ainsi dire noyé au milieu de bacilles saprophytes envahissants? Qu'il s'agisse de rechercher des bacilles typhiques ou dysentériques dans les selles, des méningocoques dans les sécrétions rhino-pharyngées, etc., le bactériologue se trouve aux prises avec les mêmes difficultés; évidemment, il doit s'efforcer, par la pratique d'une technique sûre et

délicate, à les vaincre; pour notre part, nous ne voyons pas très bien comment on peut choisir les cas « où la flore pharyngée n'est pas trop exubérante » pour pratiquer des ensemencements sur milieu horizon en usant des anciennes méthodes pour les autres cas; sans compter que s'il y a beaucoup de germes, ce n'est pas le milieu qui les diminuera et alors, si on se sert du tube, on sera tout aussi embarrassé, l'on n'aura pas plus de colonies pures qu'avec la boîte. Avec celle-ci, à condition de faire un ensemencement soigné à l'aide de l'anse de platine triangulaire, on aura sans peine des colonies isolées quelle que soit la flore de la gorge examinée.

Si on opère avec le tube, l'ensemencement est plus malaisé à effectuer; en outre, une fois qu'il est placé à l'étuve, il s'y passe des phénomènes de condensation, de ruissellement qui provoque le rougissement presque total de la surface ensemencée; dans ce cas, mieux vaut, en effet, recourir à l'ancienne méthode au sérum simple et abandonner le sérum glucosé tournesolé.

Pour éviter cet inconvénient, il n'y a qu'à observer les précautions que nous recommandons pour l'emploi du milieu horizon et pratiquer les ensemencements d'une main légère.

Lenteur. — Le diagnostic du bacille diphtérique en 16 heures est devenu un dogme, surtout dans l'esprit des médecins traitants qui, ayant retenu ce chiffre, harcèlent le bactériologue en exigeant de sa part un diagnostic très rapide.

En réalité, ce chiffre de 16 heures est court : si l'on consulte les auteurs, on voit qu'il est question de 20 à 24 heures.

On a reproché au milieu horizon de ne donner que tardivement des colonies caractéristiques; en général la réponse peut être fournie en 30 heures; le délai de 48 heures donné en parlant de ce milieu est inexact; il n'a jamais été indiqué par nous; mais il faut remarquer qu'avec ce milieu, on a non seulement des colonies isolées, pures, mais encore l'épreuve de fermentation du glucose; c'est comme si on avait fait un isolement suivi de réensemencement sur milieu sucré tournesolé; il n'y a donc pas de temps de perdu, au contraire, et, même dans le cas d'ensemencement provenant de la gorge, on peut porter du premier coup un diagnostic ferme sur cette simple épreuve; on peut comparer toutes les autres méthodes, aucune ne donne ce résultat en aussi peu de temps.

AVANTAGES

I. *Milieu d'isolement et d'identification.* — Le principal avantage du milieu horizon consiste en ce qu'il constitue à la fois un milieu d'isolement et d'identification. A la suite d'un premier ensemencement du produit suspect, on a, à l'état de pureté, des colonies dont la coloration permet d'apprécier le caractère fermentatif vis-à-vis du glucose.

Après un simple examen microscopique d'une préparation colorée par la méthode de Gram, cela suffit pour poser le diagnostic de bacille diphtérique s'il s'agit d'un examen de gorge; la rareté du corynebacterium cutis, dans ce cas-là, fait qu'on peut borner là toutes les recherches et aboutir à un diagnostic exact d'emblée.

L'ensemencement du milieu horizon peut être effectué indépendamment des recherches que chacun est libre d'entreprendre ensuite et quelles que soient ses idées (recherche des granulations, décoloration par l'alcool, ensemencements en tube de Veillon ou sur milieux divers, etc.); les examens que l'on peut pratiquer ensuite sont d'autant plus facilités que l'on peut partir de colonies bien isolées, bien distinctes et caractéristiques.

II. *Diagnostic exact en 24 à 36 heures, au maximum.* Nous avons vu plus haut que lorsqu'il s'agissait de l'examen d'une gorge, on pouvait avoir le diagnostic exact en 24 à 36 heures. Quand l'examen bactériologique porte sur une dépendance du tégument cutané (œil, plaie, muqueuses diverses, etc.), l'ensemencement simultané sur milieu horizon glucosé et saccharosé donne également un diagnostic ferme dans le même laps de temps.

III. *Appréciation de la richesse en bacilles.* — L'usage du milieu horizon tel que nous l'avons décrit permet d'apprécier le nombre des bacilles puisque les colonies, avec un peu d'habitude, sont très reconnaissables. On peut donc suivre, chez un malade, un convalescent ou un porteur, la richesse en bacilles que présente sa gorge, par suite apprécier l'évolution de la maladie, l'action du traitement et tirer toutes conclusions utiles à la prophylaxie.

IV. *Travail simplifié et rapide.* — Où l'on voit bien surtout l'avantage de la méthode, c'est lorsqu'on a un grand nombre d'examens à effectuer; c'est là qu'on reconnaît combien le travail est simplifié, comment il s'exécute plus rapidement et avec une plus grande facilité qu'avec la méthode courante; je ne parle pas de la sûreté du diagnostic dont je me suis déjà occupé. Il nous est arrivé souvent d'avoir à effectuer 60, 100 et même 150 examens; nous y passions relativement peu de temps, et encore nous examinions accessoirement les bacilles d'Hofmann, chose qu'on n'a pas à faire dans un laboratoire de diagnostic courant; l'examen de 60 individus nous demandait moins d'une heure.

A l'examen des boîtes, une grande partie ne présente que des colonies blanches ; dans la recherche des porteurs leur nombre est encore relativement élevé : elles sont éliminées; parmi celles qui ont des colonies rouges, l'examen à l'œil nu et à la loupe permet d'éliminer un deuxième lot de boîtes ne renfermant pas de colonies semblables à celles du bacille diphtérique; enfin, il ne reste que le dernier lot, celui qui renferme des colonies suspectes.

Au bout de très peu de temps de pratique du milieu horizon, on acquiert une habitude telle qu'on pourrait faire le diagnostic de bacille diphtérique par simple examen macroscopique des boîtes; on finit par connaître l'aspect de toutes les colonies rouges; le seul diagnostic différentiel important à faire consiste à reconnaître le bacille diphtérique et les staphylocoques ; or, rien n'est plus aisé : l'aspect, la couleur, la consistance des colonies diffèrent tellement qu'un examen microscopique peut n'être qu'une confirmation presque superflue du diagnostic macroscopique; toutefois, malgré la sûreté du coup d'œil, cet examen doit nécessairement être pratiqué, car on n'a pas le droit de travailler à la légère lorsqu'il s'agit de la santé humaine.

V. *Prophylaxie facilitée.* — La prophylaxie de la diphtérie a grandement bénéficié de ce procédé de recherches; alors qu'au début de la guerre, on arrivait à isoler des effectifs importants parmi lesquels il y avait peu de porteurs de bacilles diphtériques et beaucoup de porteurs de

bacilles d'Hofmann, l'emploi de cette méthode a permis de n'isoler qu'à bon escient les porteurs du germe pathogène authentique dont le nombre d'ailleurs, en milieu contaminé, a été reconnu vraiment peu considérable, en comparaison des chiffres fournis antérieurement; de cette façon les mesures prophylactiques ont retrouvé auprès des médecins et des autorités militaires le crédit qu'elles avaient fini par perdre; l'isolement intelligemment pratiqué des porteurs reconnus comme tels à propos de chaque cas de maladie à la suite de bons diagnostics a permis de maintenir les effectifs des armées dans un excellent état sanitaire; cela est surtout vrai en particulier pour les bataillons d'instruction composés de jeunes sujets en état de réceptivité par suite du changement de vie, d'habitudes et de climat, des fatigues qui étaient la conséquence de leur entraînement intensif, et qui nous arrivaient souvent de l'intérieur avec quelques cas de diphtérie.

VI. *Base des travaux de recherches sur les diphtéries humaine et animale.* — L'emploi du milieu horizon s'impose à la base de tous les travaux et recherches ayant pour objet la diphtérie humaine, les diphtéries animales, ainsi que l'étude des bactéries diphtéroïdes. N'y aurait-il pas lieu, à ce point de vue, de revoir un peu les travaux qui ont été faits dans ce sens il y a quelque temps et au cours desquels on a cru trouver des bacilles diphtériques dans de nombreuses occasions, sans qu'on fût absolument sûr s'il ne s'agissait pas de corynebacterium cutis ou même simplement de bacille d'Hofmann.

Tant que la classification du bacille diphtérique et des

bactéries voisines n'était pas établie sur des bases sérieuses, tant qu'on ne s'est pas méfié de l'existence du corynebacterium cutis qui ressemble étrangement au bacille diphtérique, et enfin tant qu'on n'a pas été en possession d'une méthode de diagnostic pratique et rigoureuse, on peut dire qu'il a pu y avoir des erreurs commises.

DIAGNOSTIC DU BACILLE DE LA DIPHTÉRIE

A la lumière des données actuelles relatives au bacille diphtérique et aux bacilles diphtérimorphes, le diagnostic différentiel de ces microorganismes doit reposer uniquement sur leurs réactions vis-à-vis des sucres (en pratique glucose et saccharose).

La méthode la plus rapide et la plus sûre consiste dans l'emploi du milieu horizon qui sert à la fois à l'isolement et à l'identification. Il y a lieu de faire une distinction suivant qu'il s'agit d'examiner des malades atteints d'angine, des porteurs ou des autres localisations.

En effet, le corynebacterium cutis, qui se rencontre fréquemment sur les téguments, est très rare dans la gorge, où nous n'avons constaté sa présence que dans la proportion de 0,13 %; donc, pratiquement, le diagnostic entre ces deux germes n'est pas à faire lorsqu'il s'agira de frottis de gorge.

Voici donc comment on procédera :

a) *Angines.* — On emploiera une boîte de milieu horizon habituel (glucosé) qu'on ensemencera en suivant les recommandations que nous avons faites.

b) *Porteurs.* — Lorsqu'il s'agira de rechercher les porteurs dans un milieu contaminé, il suffira d'employer une boîte de milieu horizon habituel (glucosé) pour deux sujets, en séparant les deux moitiés de la boîte avec un trait au crayon gras traçant un diamètre au fond de la boîte.

c) *Autres localisations possibles du bacille de la diphtérie (plaies, yeux, etc.).* — Dans ce cas, on doit songer au corynebacterium cutis; on pourra recourir à deux méthodes, l'une rapide consistant à ensemencer simultanément deux boîtes de milieu horizon, l'une glucosée et l'autre saccharosée ; l'autre un peu moins rapide, mais plus rationnelle, consistant à passer sur milieu saccharosé les colonies suspectes obtenues sur une première boîte glucosée.

Les boîtes seront ensuite examinées comme nous l'avons dit; on fait une préparation que l'on colore par la méthode de Gram et le diagnostic est effectué; c'est, on le voit, d'une grande simplicité.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans la pratique courante on a à faire le diagnostic différentiel entre le bacille diphtérique et des bactéries diphtérimorphes qui lui ressemblent et que l'on rencontre souvent; nous donnons ci-dessous les caractères principaux de ces microorganismes qui suffisent à les différencier.

Corynebacterium diphteriæ, Löffler (Bacille de la diphtérie, bacille de Klebs-Löffler).

Agent pathogène de la diphtérie; virulent ou non pour les animaux; se présentant sous trois formes, longue, moyenne ou courte; produit de l'acide aux dépens du glucose, n'en produit pas aux dépens du saccharose; pousse dans la profondeur d'un tube de Veillon; doué de propriétés hémolytiques.

Le bacille diphtérique court, possédant les propriétés assignées ci-dessus, doit être envisagé comme les autres variétés de ce bacille : sa présence chez un individu doit, suivant les cas, impliquer l'usage des moyens thérapeutiques spéciaux à la diphtérie ou des mesures prophylacti-

ques nécessaires vis-à-vis de cette maladie (isolement, recherche des porteurs, etc.).

Corynebacterium commune, L. Martin (Bacille d'Hofmann, bacille pseudo-diphtérique de certains auteurs).

Saprophyte rencontré fréquemment dans le nez et la gorge des individus sains ; n'a aucun rapport avec le bacille diphtérique; de forme généralement courte (bacille en navette, en grain d'orge); ne produit pas d'acide aux dépens du glucose ni du saccharose, ne pousse qu'à la surface de la gélose Veillon; dépourvu de tout pouvoir hémolytique.

Corynebacterium cutis, nouvelle dénomination (Bacterium cutis commune, Ch. Nicolle; bacille paradiphtérique, Lubinski).

Saprophyte du tégument cutané et de ses dépendances; non pathogène, ni virulent pour les animaux; produit de l'acide aux dépens du glucose et du saccharose; pousse en général, à la fois à la surface et dans la profondeur de la gélose de Veillon; dépourvu de pouvoir hémolytique ou ne produisant parfois l'hémolyse que tardivement.

Corynebacterium xerosis, Neisser et Kuschbert (Bacille de la xérose).

Saprophyte des muqueuses oculaires, rencontré comme germe d'association, dans les cas de xérose conjonctivale; se distingue du corynebacterium cutis par ses cultures tardives, pauvres et sèches; non pathogène, ni virulent pour les animaux; produit de l'acide aux dépens du glucose et

du saccharose; pousse en surface et en profondeur dans la gélose Veillon; dépourvu de propriétés hémolytiques.

La culture sur milieux glucosés et parfois sur milieux saccharosés est le seul moyen qui permette d'effectuer le diagnostic de bacille diphtérique avec sûreté; à cet égard, l'emploi du milieu horizon est avantageux, car il constitue à la fois un milieu d'isolement et d'identification; il faut l'employer en suivant certaines recommandations; prélèvements soignés, ensemencements à l'anse de platine triangulaire et emploi de milieu horizon en boîtes de Pétri, à l'exclusion de tout autre vase de culture.

La légitimité de son emploi est suffisamment établie par l'usage qui en a été fait aux armées par nous depuis mai 1917 jusqu'à la fin de la guerre et par l'étude comparative d'un certain nombre de bacilles d'origines diverses (97 bacilles de Löffler, 93 bacilles d'Hofmann et 19 corynebacterium cutis).

Le diagnostic se fera, suivant les cas, de la façon suivante :

a) Dans les cas d'angines, ensemencer l'exsudat buccopharyngé sur une boîte de milieu horizon ordinaire (glucosé); étant donnée la rareté du corynebacterium cutis dans ce cas-là (1,3 p. 1000), on peut poser le diagnostic ferme de bacille diphtérique lorsqu'on trouve des colonies rouges qui, examinées au microscope, après coloration au Gram, font voir des bacilles ayant les caractères du bacille diphtérique.

b) Lorsqu'il s'agit de la recherche de porteurs, on pourra employer une boîte de milieu horizon ordinaire (glucosé) pour deux sujets, en traçant un diamètre avec un crayon gras sur le fond de la boîte ; dans ce cas, ne pas s'occuper non plus du diagnostic différentiel avec le corynebacterium cutis dont la présence est infiniment peu probable et opérer comme dans le cas d'une angine.

c) Lorsqu'il s'agit d'une autre localisation que la gorge (dépendances du tégument cutané, œil, plaie, etc.), on peut employer deux procédés :

L'un rapide consistant à ensemencer simultanément deux boîtes de milieu, l'une glucosée et l'autre saccharosée; la présence de colonies rouges dans les deux boîtes renfermant des bacilles ayant les caractères du bacille diphtérique indique qu'il s'agit du corynebacterium cutis; s'il n'y a des colonies rouges que sur la boîte glucosée, dans ce cas, on a affaire à du bacille diphtérique.

Le second procédé, moins rapide, consiste à pratiquer un premier ensemencement sur boîte de milieu horizon glucosé et à passer les colonies suspectes sur du milieu saccharosé.

On le voit, le diagnostic du bacille de la diphtérie est devenu facile et sûr; C. W. Broers ne serait donc plus fondé à écrire maintenant, comme il le fit en 1915 : « En lisant ces lignes, on peut avoir l'impression que le diagnostic bactériologique de la diphtérie est un travail à faire désespérer. »

Vu, *le Doyen :*

WEISS.

Vu, *le Président :*

BORREL.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Strasbourg,

CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

F. Arloing et G. Richard. — Sur la coloration vitale des corpuscules métachromatiques du bacille diphtérique. C. R. soc. biol. t. LXXXIII, 23 fév. 1920.

— Sur les corpuscules métachromatiques des corynébactéries (b. diphtérique et pseudo-diphtérique). Revue générale de botanique, t. XXXIII, 1921.

Aviragnet et Mlle Le Soudier. — Culture du bacille de la diphtérie en tubes de Veillon. Soc. mod. hôp. Paris, 29 juin 1917.

— Caractères différentiels entre le bacille de Löffler et le bacille d'Hofmann. Arch. de méd. des enfants, t. XXI, 1918.
— *Id.* Bull. soc. méd. hôp. Paris, 27 juil. 1917.

Aviragnet, Weill-Hallé et P.-L. Marie. — Le diagnostic bactériologique de la diphtérie. Journal médical franç., janv. 1920.

L. W. Axenoff. — Ueber die Wachstum bedingungen des Diphteriebacillus in Anwesenkeit von Selen und Tellursalzen. Journal de microb. Petrograde, t. I, nos 1 et 2, 1914.

J.-M. Bumenthal et Lipskerow. (Inst. ch. bact. de Ph. Blumenthal). — Vergleichende Bewertung der differentiellen methoden zur Faerbung des Diphteriebacillus. Centralbl. f. Bakt. I orig. t. XXXVIII, 18 mars 1905.

C.-W. Broers. — Folia microbiologica, t. III, 20 mai 1915.

Ed. Büsing (Int. hyg. Brême). — Ueber den Zusatz von Rindergalle zum Löfflerschen Diphterienährboden. Deutsche mediz. Woch. 5 mars 1914.

Eyio Calcaterra. (Inst. Maragliano, Gênes). — Lecithin und To-

xizität der Diphteriebacilllen-Kulturen. Centralbl. f. Bakt. I orig. IX.

Albert J. Chalmers et Norman Mac Donald. — Some Soudanese Diphteroïds. Journ.. of Tropical med. a Hyg., 15 avril 1920.

H. Conradi et P. Trocq. (Halle). — Ein Verfahren zum Nachweiss der Diphteriebacillen. München med. Wochenschr., 23 juil. 1912, LIX.

Myer Coplans. — Differential media for recognition of B. diphteriæ and associated organisms. Ebenda, p. 274..

S. Costa, J.. Troisier et J. Dauvergne. — Sur un procédé pour la recherche et la détermination rapide du bacille diphtérique chez les malades et les porteurs. C. R. soc. biol. 28 juill. 1917.

— *Id.* Note complémentaire. C. R. soc. biol., 20 oct. 1917..

— Recherche et détermination rapide du bacille diphtérique chez les malades et les porteurs. Bull. soc. méd. hôp. Paris, 12 oct. 1917.

— Action du bacille diphtérique et des faux diphtériques sur les sucres. C. R. soc. biol., 12 janv. 1918.

— Action hémotoxique du bacille diphtérique, sa valeur diagnostique. C. R.. soc. biol., 26 janv. 1918.

— Différenciation du bacille diphtérique et des faux diphtériques. C. R. soc. biol., 16 nov. 1918.

— Les porteurs de bacille diphtérique. C. R. soc. biol., 16 nov. 1918.

— Différenciation du bacille diphtérique et des faux diphtériques. Mémoire couronné par l'Académie de médecine (Prix Th. Guinchard, 10 décembre 1918).

— Le diagnostic bactériologique de la diphtérie. Presse médicale, n° 13, 6 mars 1919.

— Etude sur le bacille diphtérique et les faux diphtériques. Revue d'hygiène et de police sanitaire, t. XLI, 1919.

R. Debré, R. Letulle et L. Sergent. — Valeur des granulations de Babès pour le diagnostic bactériologique des angines diphtériques et la recherche des porteurs de germes. C. R. soc. biol. t. LXXXII, 31 mai 1919.

Debré et Letulle. — Le diagnostic rapide du bacille diphtérique

dans les angines et chez les porteurs de germes. *Presse médicale*, 11 septembre 1919, n° 51.

Dopter et Sacquépée. — Précis de bactériologie, 2e édition, 1921.

P. Durand. — Classification des bacilles diphtériques par l'agglutination. C. R. soc. biol., 16 nov. 1918.

A. A. Epstein. — A new method for staining polar bodies. Proceed of the New-York pathol. soc. t. VI, octobre 1906, n° 5.

E. Gildemeister et Gunta. — Ueber neure Verfahren zum Nachweiss von Diphteriebacillen und ihre praktische Bedeutung. Centralbl. f. bakt. I Orig. t. LXXII, 1913.

A. Hanau. — Ueber neure Diphterie-Nährboden. Inaugural dissertation der mediz. Fakultät der Universität Strassburg, 1914.

Heurlen. — Münch. medic Wochensch. LXI, mars 1914.

T. B. M. Hine. — Biochemical reactions of diphterialike organisms. Journ. of path. and bact., t. XVIII, juil. 1913.

Karl Klein. (Inst. Hyg. univ. Cologne). — Ein neuer Diphterie-Nährboden. Deutsche med. Woch., 11 mars 1920.

Klunker. — Ueber die Verwenbarkeit der Conradi-Trochschen Tellürplatte zum Diphterienachweiss. München med. Woch. 1913, 1913.

Arnold Knapp. (Columbia university New-York). — The differenciation of Bacillus diphteriæ, B. xerosis and B. pseudodiphteriæ, by ferm. tests in the serum water media of Hiss. Journ. of medic. research, t. XII, novembre 1904.

R. Knowles. — The association of the bacillus of Hofmann with diphteria in India. Ind. Journ. of med. Res., t. VII, juil. 1919.

Kolle et Wassermann. — Handbuch der pathogenen mikroorganismen. Iena, 1913, t. V (article diphtérie, M. Neisser et H. A. Gins).

John *A.* Kolmer et Emily L. Moshage. — The relation of the carbohydrate splitting ferments to the soluble toxins of diphteria bacilli. Journ. of inf. dis.., t. XIX, juil. 1916.

Landau. — Ueber die Gramfestigkeit von Diphterie und diphterieähnlichen Bacillen und ihre differential diagnostische Bedeutung. Berlin, klin. Woch., 9 oct. 1916.

H. Langer. (Charlottenbourg). — Ein sparsamer Blutserumnähr-

boden für die Diphteriediagnose. Deutsche med. Woch., 27 avril 1917.

H. Langer et Krüger. (Charlottembourg). — Die Gramfestigkeit der Diphteriebacillen als differential diagnostisches Merkmal. Deutsche medic. Woch., 15 juin 1916, 23 août 1917.

Lehmann et Neumann. — Manuel de bactériologie, édition française. Philibert, 1913.

Lemoigne. — Fermentation butylène glycolique des hydrates de carbone par le vibrion cholérique et pseudo-cholérique et par les bacilles diphtérique et pseudo-diphtérique. C.R. soc. biol., 1920.

Lesiéur. — Des bacilles pseudo-diphtériques. Thèse de Lyon, 1901.

P.-P. Lévy. — Le bacille de la diphtérie dans l'organisme. Thèse de doctorat, fac. méd. Paris, 1914.

P.-F. Lomry. — Du diagnostic de la diphtérie par l'exercice microscopique direct. Ann. Inst. Pasteur, XXXIII, 1919.

Lomry et Gillet. — Sur la différenciation du bacille diphtérique et du bacille de Hofmann. Bull. Ac. roy. méd. de Belgique, 1919.

— La lutte contre la diphtérie dans le Luxembourg belge. Revue d'hygiène, t. XLII, nos 7 et 8, 1920.

Lubeneau. — Centralbl. f. Bakt., XXX, n° 10.

Herbert Lubinski. — Bakteriologische Untersuchungen über Wunddiphterie. Centralbl. f. Bakt., I, t. LXXXV, 1920.

Mandelbaum und Heinemann. — Centralbl. f. Bakt., 1 abt orig., Bd. 53, 1910..

Markl et F. Pollak. — Kritisch experimentellen Beitrag zur Differentialdiagnose der Diphterie und Pseudodiphteriebazillen nebst Beobachtungen über das Vorkommen derselben im Rachen Gesunder. Wien. klin. Woch., t. XXVI, 2 oct. 1913.

L. Martin et G. Loiseau. — Culture du bacille de la diphtérie en tubes de Veillon. C. R. soc. biol., t. LXXIX, 22 juil. 1917.

L. Martin — Les porteurs de germes diphtériques. C. R. soc. biol., t. LXXXI, 16 nov. 1918.

L. Martin et G. Loiseau. — Le bacille diphtérique. Bull. méd. n° 13, 1921.

— Les pseudo-diphtériques. Bull. Ac. médecine, 21 janv. 1919.

Morse M. — Etude du groupe diphtérique par les méthodes biométriques. Journ. of infect. diseases, XI, 1912.

Emilie L. Moshage et J. Kolmer. — A study of acid-production by diphteria bacilli. Journ. of inf. dis., t. XIX, juil. 1916.

Paul Münzberg. (Inst. hyg. Univ. Breslau). — Die gramfestigkeit der Diphterie und Pseudodiphterie bazillen und ihre differential diagnostische Bedeutung. Deutsche med. Woch., 23 août 1917.

Neisser. — 7 Tagung der freien Vereinigen f. mikrob. in Berlin, mars-avril 1913.

Helen R. Odell. — Comparaison of Loeffler's coagulated blood serum with the addition of sterile oxgall. Journ. of bacter., t. III, mars 1918.

A. Orticoni et H. Leclerc. — Conditions de l'infection diphtérique dans les armées en campagne. C. R. soc. biol., 16 novembre 1918.

M. Pergola. — Contributo alla diagnosi batteriologica della difterite. Ann. d'Ig., t. XXVIII, 31 mars 1918.

— Indagini considerazioni su alcune proprietà del bacillo difterico con speciale riguardo di granuli metachromatici. Ann. d'Igiène, t. XXIX, 30 avril 1919.

Port. (Hôp. Augsbourg). — Ueber diphterieähnliche Bazillen in Auswurf. Berlin. Klin. Woch., 18 mars 1918.

T. Thomson Rankin. — A medium for bacillus diphteriæ (potassium sulfocyanide neutral red glucose serum). Journ. of hyg., XI, juill. 1911.

Reh. — Revue méd. de la Suisse romande, XXXV, 1915.

H. Reiter. — Beiträge zur Diphteriediagnose. Deutsche med. Woch., n° 18, 1915.

Sacquépée. — Les porteurs de bacille diphtérique. Bull. Institut Pasteur, 1910, n° 16.

E.-F. Schmid. — Ueber Wunddiphterie. Münch. mediz. Woch., 17 janv. 1919.

K. E. F.. Schmitz. — Ueber die Gramfestigkeit der Diphteriebacillen und ihre theoretische une praktische Bedeutung. Berlin. klin. Woch., 5 fév. 1917.

Schürmann et E. Hajos. (Inst. mal. inf., Berne). — Erfahrung mit Tellurnährböden bei der bakteriologischen Diphteriediagnose. Deutsche med. Woch., 24 avril 1913.

Schwoner. — Centralbl. f. Bakt., xxxv, n° 5.

Stévenin. — La fermentation des sucres et l'anaérobiose du bacille diphtérique. Bull. soc. méd. hôp. Paris, 20 juil. 1917.

— Le bacille court (corynebacterium commune) et la diphtérie. Journ. de physiol. et de pathol. gén., t. xviii, déc. 1919.

Thoinot et Masselin. — Précis de microbie. 4e édit., 1902.

L. Tompakow. — Ueber den Wert der neuen Conradischen Verfahren für die Diphteriediagnose.. Arch. f. Hyg., lxxxiii.

Tribondeau et Dubreuil. — Procédé de coloration des granulations polaires du bacille diphtérique. C.-R. soc. biol., lxxx, 31 mars 1917.

Wagner. — Verfahren mit der Conradi-Trochschen Tellurplatte zum Diphterienachweiss. Münch. med. Woch., 1913, n° 9.

H. Zinsser. (Columbia university New-York). — A study of diphteria group of organisms with special reference tofermentation reactions. Jour. med. research., t. xvii, 3 déc. 1907.

NIORT - IMP. NOUVELLE - G. CLOUZOT